



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado

“Saccharomyces cerevisiae como herramienta para estudiar proteínas del metabolismo de hemo de Trypanosoma cruzi”

Presentada por Brenda Analía Cirulli

Rosario, Argentina

2018

**"*Saccharomyces cerevisiae* como herramienta para estudiar proteínas del
metabolismo de hemo de *Trypanosoma cruzi* "**

Brenda Analía Cirulli

Licenciada en Biotecnología
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctora en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Biología y Bioquímica de *Trypanosoma cruzi* del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR), dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas - Universidad Nacional de Rosario, durante el período comprendido entre Abril de 2013 y Marzo de 2018, bajo la dirección de la Dra. Julia Alejandra Cricco.

Directora: Dra. Julia A. Cricco

Dra. Pamela Cribb

Dra. Karina Tripodi

Dra. Elina Welchen

En primer lugar quiero agradecer a Julia por dirigirme durante estos años, por su apoyo para la realización de esta tesis, por la formación recibida, por la paciencia. .

A todos los que pasaron por el laboratorio y compartimos mesada, charlas y alguna cervecita: Marce, Lucas, Jero, Eve, Ma. Gabriela y Lucy A Esteban y todo el grupo Bromo, Pame, Isa, Vicky, Lucho, Vir y Ale.

A los amigos de siempre que me apoyaron y apoyan aunque no entiendan del todo esto de hacer ciencia, Euge, Sil, Debo, Gonza, David.

A mi familia, que siempre está.

I-Índice

| | |
|--|----|
| I- Índice..... | 3 |
| Abreviaturas y símbolos..... | 8 |
| Lenguaje especial..... | 11 |
| II- Resumen..... | 12 |
| III- Introducción..... | 16 |
| III.1 La Enfermedad de Chagas..... | 17 |
| III.1.1 Vectores y hospedadores..... | 17 |
| III.1.2 Formas de transmisión..... | 18 |
| III.1.3 Etapas de la enfermedad y tratamiento..... | 19 |
| III.1.4 Impacto..... | 20 |
| III.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> | 21 |
| III.2.1 Ciclo de vida..... | 21 |
| III.2.2 Estructura celular..... | 23 |
| III.2.3 Metabolismo..... | 25 |
| III.3 La problemática de la adquisición de hemo en <i>Trypanosoma cruzi</i> | 26 |
| III.3.1 Relevancia del grupo hemo..... | 26 |
| III.3.1.1 El hemo en <i>Trypanosoma cruzi</i> | 30 |
| III.3.2 Transporte de hemo..... | 31 |
| III.3.2.1 Transporte de hemo en la mitocondria..... | 34 |
| III.3.2.2 Proteínas citosólicas de unión a hemo..... | 38 |
| III.3.2.3 Transporte intercelular..... | 38 |
| III.3.2.4 Transportadores de tipo ABC..... | 40 |
| III.4 Herramientas bioquímicas, genéticas y moleculares para estudiar a <i>Trypanosoma cruzi</i> | 42 |
| III.5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 45 |
| III.5.1 Biosíntesis de hemo en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 46 |
| III.5.2 Funciones del hemo B en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 48 |
| III.5.3 Transporte de hemo en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 49 |
| III.6 Objetivos..... | 51 |
| III.6.1 Objetivos generales..... | 52 |
| III.6.2 Objetivos específicos..... | 52 |
| IV- Materiales y Métodos..... | 53 |
| IV.1 Herramientas bioinformáticas..... | 54 |
| IV.1.1 Bases de Datos..... | 54 |
| IV.1.2 Análisis de secuencias..... | 54 |

| | |
|---|----|
| IV.2 Plásmidos y oligonucleótidos utilizados..... | 55 |
| IV.2.1 Plásmidos..... | 55 |
| IV.2.2 Oligonucleótidos..... | 58 |
| IV.3 Cepas y líneas celulares utilizadas..... | 58 |
| IV.3.1 Cepas bacterianas..... | 58 |
| IV.3.2 Cepas de levaduras..... | 58 |
| IV.3.3 Líneas celulares..... | 59 |
| IV.4 Técnicas de cultivo..... | 59 |
| IV.4.1 Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i> | 59 |
| IV.4.2 Medios de cultivo para levadura..... | 59 |
| IV.4.2.1 Determinación de Densidad Óptica..... | 61 |
| IV.4.3 Cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 61 |
| IV.4.3.1 Recuento de parásitos..... | 61 |
| IV.4.4 Congelado de cepas..... | 62 |
| IV.5 Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos..... | 62 |
| IV.5.1 Purificación de ADN plasmídico..... | 62 |
| IV.5.2 Determinación de la concentración de ADN..... | 63 |
| IV.5.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)..... | 63 |
| IV.5.3.1 Amplificación de las secuencias codificantes de <i>mtTcABCB.HISnonstop</i> y <i>TcCOX10.HISnonstop</i> | 63 |
| IV.5.3.2 Amplificación de la secuencia codificante de GFP..... | 64 |
| IV.5.4 Electroforesis de ADN en geles de agarosa..... | 65 |
| IV.5.5 Purificación de bandas a partir de gel de agarosa..... | 66 |
| IV.5.6 Digestión de ADN con enzimas de restricción..... | 66 |
| IV.5.7 Ligación de fragmentos de ADN..... | 66 |
| IV.5.8 Preparación de células de <i>Escherichia coli</i> DH5 α competentes y transformación..... | 66 |
| IV.5.9 PCR de colonia..... | 67 |
| IV.5.10 Resolución de secuencias de ADN..... | 69 |
| IV.5.11 Transformación de células de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 69 |
| IV.5.12 Transfección de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 70 |
| IV.6 Técnicas de manipulación de proteínas..... | 71 |
| IV.6.1 Cuantificación de proteínas por método de Bradford..... | 71 |
| IV.6.2 Electroforesis SDS-PAGE de proteínas..... | 71 |
| IV.6.3 Western blot..... | 72 |

| | |
|---|-----|
| IV.6.4 Purificación de anticuerpos anti-TcCox10 y anti-mtTcAbcB a partir de suero inmune..... | 74 |
| IV.6.5 Obtención de extractos proteicos totales de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 76 |
| IV.6.6 Preparación de extracto mitocondriales crudos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ... | 77 |
| IV.6.7 Digestión con Proteinasa K de extractos mitocondriales de levadura..... | 78 |
| IV.6.8 Obtención de extractos celulares totales de epimastigotes..... | 79 |
| IV.6.9 Fraccionamiento de extractos totales de epimastigotes por centrifugación diferencial..... | 79 |
| IV.7 Estudio de expresión de genes recombinantes de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 80 |
| IV.7.1 Ensayo de complementación en el sistema heterólogo <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 80 |
| IV.7.1.1 Por estriado..... | 80 |
| IV.7.1.2 Drop Test..... | 80 |
| IV.7.2 Mediciones de consumo de oxígeno..... | 81 |
| IV.8 Microscopía..... | 81 |
| IV.8.1 Observación de células de levadura que contienen GFP recombinante..... | 81 |
| IV.8.2 Tinción mitocondrial en epimastigotes..... | 82 |
| IV.8.3 Técnica de Inmufluorescencia indirecta (IFI)..... | 82 |
| V- Resultados y Discusión..... | 84 |
| V.1 La proteína mtTcAbcB y su posible rol en el transporte mitocondrial de hemo..... | 85 |
| V.1.1 Caracterización de un posible transportador de hemo en <i>Trypanosoma cruzi</i> . Resultados previos obtenidos en el laboratorio..... | 87 |
| V.1.2 Resultados..... | 92 |
| V.1.2.1 Obtención de herramientas moleculares para el estudio de mtTcAbcB.... | 92 |
| V.1.2.1.1 Construcción de la secuencia recombinante <i>mtTcABCB.HIS-GFP</i> | 92 |
| V.1.2.1.2 Clonado de las secuencias recombinantes <i>mtTcABCB.HIS</i> y <i>mtTcABCB.HIS-GFP</i> en vectores disponibles..... | 95 |
| V.1.2.1.3 Construcción del vector de expresión pRS414M25..... | 97 |
| V.1.2.1.4 Purificación de anticuerpos anti-mtTcAbcB..... | 100 |
| V.1.2.2 Análisis de la expresión de las formas recombinantes de mtTcAbcB en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 100 |
| V.1.2.2.1 Expresión de mtTcAbcB.His en células <i>hem1Δ</i> | 102 |
| V.1.2.2.2 Expresión de mtTcAbcB.His-GFP en células <i>hem1Δ</i> | 106 |
| V.1.2.2.3 Expresión de mtTcAbcB y TcHTE en células <i>hem1Δ</i> | 108 |

| | |
|---|-----|
| V.1.2.2.4 Expresión de las formas recombinantes de mtTcAbcB.His en células <i>mdl1Δ</i> | 109 |
| V.1.2.2.5 Expresión de las formas recombinantes de mtTcAbcB en células <i>atm1Δ</i> | 111 |
| V.1.3 Estudio de la proteína mtTcAbcB en <i>Trypanosoma cruzi</i> . Perspectivas..... | 113 |
| V.1.4 Conclusiones | 115 |
| V.2 TcCox10 y la biosíntesis de hemo A en <i>Trypanosoma cruzi</i> | 117 |
| V.2.1 Análisis de la enzima HOS en <i>Trypanosoma cruzi</i> . Resultados previos obtenidos en el laboratorio..... | 117 |
| V.2.2 Resultados..... | 122 |
| V.2.2.1 Obtención de herramientas moleculares para el estudio de TcCox10..... | 122 |
| V.2.2.1.1 Construcción de la secuencia recombinante <i>TcCOX10.HIS-GFP</i> | 122 |
| V.2.2.1.2 Clonado de la secuencia recombinante <i>TcCOX10.HIS-GFP</i> en vectores de expresión disponibles..... | 124 |
| V.2.2.2 Análisis de la expresión de TcCox10.His-GFP en <i>S. cerevisiae cox10Δ</i> | 125 |
| V.2.2.2.1 Ensayos de complementación en placa en células <i>cox10Δ</i> | 125 |
| V.2.2.2.2 Evaluación del consumo de oxígeno en células <i>cox10Δ</i> | 127 |
| V.2.2.2.3 Detección de TcCox10.His y TcCox10.His-GFP en extractos crudos mitocondriales..... | 129 |
| V.2.2.2.4 Orientación de las HOS en membrana mitocondrial de levadura.. | 131 |
| V.2.2.2.5 Detección de TcCox10.His-GFP por microscopía de fluorescencia..... | 132 |
| V.2.2.3 Modelo propuesto para explicar la actividad de TcCox10 en <i>Sacchomyces cerevisiae</i> | 135 |
| V.2.2.4 Localización subcelular de TcCox10 en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 137 |
| V.2.2.4.1 Detección de TcCox10.His y TcCox10.His-GFP en extractos totales..... | 137 |
| V.2.2.4.2 Detección de TcCox10 en fracciones subcelulares..... | 138 |
| V.2.2.4.3 Detección de TcCox10.His-GFP por microscopía de fluorescencia..... | 139 |
| V.2.3 Funcionalidad de la proteína TcCox10 en <i>Trypanosoma cruzi</i> . Perspectivas..... | 140 |
| V.2.4 Conclusiones particulares..... | 141 |
| VI- Conclusiones..... | 142 |
| VII- Bibliografía..... | 146 |

Abreviaturas y Símbolos

| | |
|-------------------------------|---|
| ABC | familia de proteínas de membrana que utilizan ATP para transportar solutos (por <i>ATP binding cassette</i>) |
| ADN | ácido desoxirribonucleico |
| Amp | ampicilina |
| ARNm | ácido ribonucleico mensajero |
| ATP | adenosina trifosfato |
| BSA | albumina sérica bovina |
| CcO | citocromo c oxidasa |
| Clm | cloranfenicol |
| ClmR | resistencia a cloranfenicol |
| C-terminal | carboxilo terminal |
| Da | Dalton |
| DS | desvío estándar |
| DO | densidad óptica |
| DO ⁶⁰⁰ | densidad óptica a 600 nm |
| EROs | especies reactivas del oxígeno |
| Fe-S | centros ferrosulfurados |
| G418 | geneticina |
| G418R | fenotipo de resistencia a geneticina |
| Gal | galactosa |
| GFP | proteína verde fluorescente (<i>Green Fluorescent Protein</i>) |
| Gli-EtOH | glicerol y etanol |
| Glu | glucosa |
| GR | glóbulos rojos |
| H ₂ O _d | agua destilada |
| HAS | hemo A sintasa |
| HIS | secuencia codificante de 6 histidinas |
| HO | hemo oxigenasa |
| HOS | hemo O sintasa |
| HSA | albúmina sérica humana |

| | |
|------------|---|
| HTE | proteína que facilita la incorporación de hemo (<i>heme transport enhancer</i>) |
| Hyg | higromicina B |
| HygR | fenotipo de resistencia a higromicina B |
| IFI | Inmunofluorescencia Indirecta |
| Kan | kanamicina |
| KanR | resistencia a kanamicina |
| LB | medio rico Luria-Bertani |
| LIT | medio indefinido, infusion hígado triptosa (<i>Liver Infusion Tryptose</i>) |
| N-terminal | amino terminal |
| NBD | dominio de unión a nucleótido (<i>nucleotide-binding domain</i>) |
| O.N. | durante toda la noche |
| PAGE | electroforesis en geles de poliacrilamida (<i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>) |
| pb | pares de bases |
| PBS | tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>) |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) |
| PMSF | fluoruro de fenilmetilsulfonilo (<i>PhenylMethylSulfonyl Fluoride</i>) |
| RE | retículo endoplasmático |
| rpm | revoluciones por minuto |
| SCDO | Sintético Completo <i>Drop Out</i> mix, medio de cultivo sintético selectivo |
| SD | Sintético Depletado, medio de cultivo mínimo |
| SDS | dodecilsulfato sódico (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>) |
| SFB | suero fetal bovino |
| TAE | solución tampón Tris Acetato EDTA |
| Tet | tetraciclina |
| TetR | resistencia a tetraciclina |
| TMD | dominio transmembrana (<i>transmembrane domain</i>) |

| | |
|-------|--|
| YPD | <i>yeast peptone extract</i> , medio rico con glucosa |
| YPGal | idem anterior con galactosa como fuente de carbono |
| YPGli | idem anterior con glicerol-etanol como fuente de carbono |

Lenguaje Especial

| | |
|--------------------------------------|--|
| <i>kit</i> | Conjunto de instrumentos y soluciones que sirven para realizar un procedimiento experimental |
| <i>loop</i> | bucle |
| <i>cluster</i> | Complejos moleculares con enlaces metal-metal que forman estructuras cerradas triangulares o de mayor tamaño |
| <i>transplicing</i> | proceso de corte y unión de exones de ARNm |
| <i>editing</i> | proceso por el cual se producen cambios discretos en la secuencia de un ARNm |
| <i>knock out</i> | anulado, inactivado |
| <i>carrier</i> | transportador |
| <i>stripping</i> de nitrocelulosa | proceso de eliminación de anticuerpos unidos a membranas de nitrocelulosa |
| codón <i>stop</i> | secuencia de ARNm que indica el fin de su traducción |
| SDS-PAGE | electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS |
| solución <i>stock</i> | solución madre, solución concentrada |
| <i>vortex</i> | dispositivo para agitar tubos o frascos de líquido |
| Western blot | inmunodetección de proteínas separadas por electroforesis y transferidas a una membrana de nitrocelulosa |

II- Resumen

El eucariota unicelular *Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas (Rassi y col., 2010). Tiene un ciclo de vida complejo que alterna entre dos hospedadores y al menos tres estadios diferentes. Sus necesidades nutricionales incluyen auxotrofía por el grupo hemo, dado que carece de las enzimas necesarias para su síntesis. *T. cruzi* debe incorporar el cofactor a partir del hospedador mamífero o invertebrado para suplir de hemo a las numerosas hemoproteínas que posee (incluidas las de los complejos de cadena respiratoria mitocondrial) (Korený y col., 2010; Tripodi y col., 2011). La posterior conversión del hemo incorporado a la forma hemo A, cofactor del complejo IV o CcO (citocromo c oxidasa), ocurre a través de dos reacciones enzimáticas secuenciales mediadas por una Hemo O Sintasa (HOS o Cox10) y una Hemo A Sintasa (HAS o Cox15). Ambas enzimas se localizan en la membrana interna mitocondrial en eucariotas y están altamente conservadas (Brown y col., 2002; Zee y Glerum, 2006). En nuestro laboratorio se identificaron las secuencias codificantes para las enzimas del tipo HOS y HAS en el genoma *T. cruzi*, las cuales se denominaron *TcCOX10* y *TcCOX15*, respectivamente (Buchensky y col., 2010). Respecto al transporte de hemo en eucariotas, éste no está muy bien caracterizado y, particularmente en tripanosomátidos, se desconocen cuáles son las proteínas involucradas y cómo operan aunque en los últimos años se han realizado algunos hallazgos (Horáková y col., 2015; Martínez-García y col., 2016; Merli y Pagura y col., 2016). Por otro lado, *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo eucariota unicelular de vida libre, no patógeno, y es ampliamente utilizado como modelo de estudio biológico de otros eucariotas debido a estas y otras numerosas características que resultan ventajosas a la hora de su manipulación (Karathia y col., 2011). Además es capaz de sintetizar hemo, utilizando una ruta altamente conservada a través de la evolución que culmina en la matriz mitocondrial. También es capaz de sintetizar hemo A mediante las enzimas ScCox10 y ScCox15 mitocondriales. *S. cerevisiae* posee 3 transportadores de tipo ABC mitocondriales, pero ninguno de ellos es específico para hemo; se denominan Atm1, Mdl1 y Mdl2 (Jungwirth y Kuchler, 2006).

En este trabajo de Tesis nos proponemos estudiar proteínas con posible rol en el metabolismo y transporte de hemo mitocondrial de *T. cruzi* utilizando a *S. cerevisiae* como sistema modelo. Es así que analizamos la posible función de la proteína codificada por el gen de *T. cruzi* que denominamos *mtTcABCB*, homólogo a la proteína

de mamíferos ABCB6 involucrada en el transporte mitocondrial de porfirinas. Además, profundizamos el estudio del rol funcional de TcCox10, una de las enzimas de la biosíntesis de hemo A.

Respecto al transporte mitocondrial de hemo, se evaluó la capacidad de mtTcAbcB de transportar hemo en mitocondria de *S. cerevisiae*. Los resultados obtenidos no nos permitieron elucidar la función de mtTcAbcB en mitocondria. Ensayos adicionales nos permitieron descartar su función de transporte de porfirinas en membrana plasmática de *S. cerevisiae*. La proteína recombinante mtTcAbcB.His-GFP se expresa en levaduras dado que se ha visualizado su fluorescencia intrínseca en el interior de las células. Si bien no podemos inferir sobre la función a la proteína de *T. cruzi* mtTcAbcB en *S. cerevisiae*, los resultados obtenidos tampoco nos permiten descartar su probable función como transportador de hemo mitocondrial en *T. cruzi*. En el análisis de estos resultados se debe considerar que, al ser *S. cerevisiae* capaz de sintetizar hemo, posiblemente no sea este el modelo adecuado para estudiar el transporte de hemo al interior mitocondrial.

Para completar y profundizar el estudio de la enzima HOS de *T. cruzi* (TcCox10) se construyó una versión recombinante con fusión a GFP, TcCox10.His-GFP. La misma se visualizó intracelularmente en *S. cerevisiae* en lo que parecen ser vesículas y al menos parte se detectó en mitocondrias. La funcionalidad de TcCox10.His-GFP se demostró mediante ensayos de complementación en placa de células de *S. cerevisiae* *cox10Δ* y, de forma complementaria, por medidas de consumo de O₂ de las mismas células *cox10Δ* transformantes. Algunos de los resultados obtenidos indican que la fusión a GFP altera de alguna manera la eficiencia de TcCox10 como HOS y permiten postular un posible modelo de ruta del hemo en *S. cerevisiae* y en *T. cruzi*. Un análisis predictivo de los segmentos transmembrana y orientación de cada proteína utilizando distintos algoritmos arroja resultados que también apoyarían este modelo.

La expresión de TcCox10.His-GFP en epimastigotes de *T. cruzi* confirmó la localización mitocondrial de la proteína de fusión.

En función de los resultados obtenidos en nuestro laboratorio tanto con TcCox10 como con TcCox15 (Tesis doctoral del Dr. Marcelo L. Merli) así como los resultados obtenidos en otros grupos de investigación con los transportadores de *Leishmania* y de *T. brucei*, consideramos que *S. cerevisiae* es un modelo válido para el

estudio funcional de proteínas de otros organismos eucariotas cuyo ortólogo esté presente también en la levadura, mientras que para el estudio de proteínas con funciones no identificadas en levadura se deben tener en cuenta las limitaciones del modelo.

III- Introducción

III.1 La Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, es una enfermedad parasitaria sistémica, generalmente crónica, causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, y por esta razón también se la conoce como *tripanosomiasis americana*. Esta enfermedad es endémica en América Latina, región donde afecta a 8 millones de personas de las cuales casi 2 millones se encuentran en Argentina, produciendo un impacto económico considerable (Coura y Vinas, 2010; Rassi y col., 2010). En la actualidad, es también relevante en otros países de regiones no endémicas como EE.UU., Europa y Asia, donde se ha reportado cada vez mayor número de casos, muchos debidos a los crecientes movimientos migratorios de la población y a la falta de controles de la enfermedad. Cabe mencionar que, si bien en Europa no hay insectos que puedan transmitir a *T. cruzi*, si los hay en EE.UU., África y parte de Asia (Coura y Vinas, 2010).

La enfermedad lleva el nombre de Carlos Chagas, médico e investigador brasileño que describió por completo la enfermedad, identificando el patógeno, el vector y el hospedador (Chagas, 1909). En nuestro país, fue el médico Salvador Mazza quien llevó adelante las investigaciones a partir de 1926.

III.1.1 Vectores y hospedadores

T. cruzi puede ser transmitido por más de 100 especies de triatomíneos que pertenecen a 3 géneros de la familia *Reduviidae* subfamilia *Triatominae*: *Panstrongylus*, *Triatoma* y *Rhodnius*. Los vectores más importantes en zonas urbanas son *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*; en Argentina el más importante es *T. infestans*, generalmente conocido como vinchuca (Figura 1). Estos insectos poseen actividad nocturna y se esconden en las grietas de las paredes de barro de las casas, mientras que en la naturaleza habitan en palmeras, árboles huecos, cuevas y debajo de piedras. Con respecto a los animales reservorio de la enfermedad, son otras 100 las especies de vertebrados que pueden infectarse, entre las que se encuentran desdentados, marsupiales, primates, mascotas y animales de granja, y el ser humano (Clayton, 2010; Fernandes y Andrews, 2012).

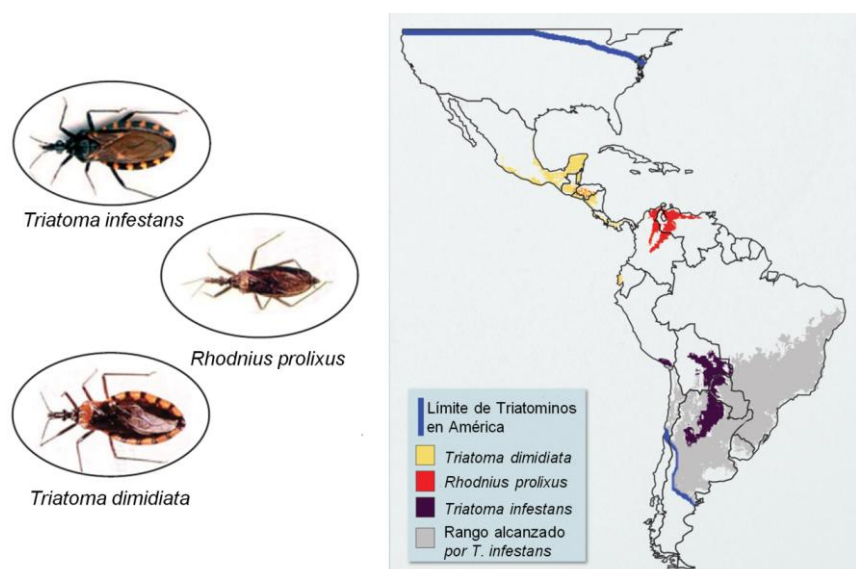


Figura 1. Distribución geográfica de los tres principales vectores domésticos de la enfermedad de Chagas-Mazza: *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans*. Diferentes campañas han reducido el área alcanzada por los vectores, como se muestra para *T. infestans*. Adaptado de Rassi y col., 2010 y de Schofield y Gorla, 2010.

III.1.2 Formas de transmisión

Existen diferentes formas de transmisión de la enfermedad, de las cuales la principal es la vectorial. *T. cruzi* habita en el interior del tracto digestivo del insecto vector hematófago, y cuando éste se alimenta de la sangre de otro organismo, es liberado con las heces ingresando al nuevo hospedador a través de la herida de la picadura. Además, el parásito puede entrar a través de la piel dañada por cualquier lesión, o a través de mucosas como los ojos o la boca. Otras vías de transmisión de menor incidencia son: la transmisión oral, a través del consumo de alimentos contaminados con insectos portadores o sus heces; por transfusión de sangre o trasplante de órganos infectados; por transmisión de madre infectada a hijo durante el embarazo -a través de la placenta- o durante el parto (Chagas congénito); por accidentes de laboratorio al manipular el parásito en tareas de investigación y, recientemente se han obtenido evidencias en modelos de laboratorio de transmisión por vía sexual (Alarcón de Noya y col., 2010; Clayton, 2010; Ribeiro y col., 2016).

Hasta la fecha el mecanismo más efectivo para la prevención sigue siendo el control del vector (insecto hematófago) y el mejoramiento de las viviendas en las zonas endémicas para interrumpir la transmisión vectorial. La fumigación con insecticidas ha sido muy efectiva pero han aparecido triatomíneos resistentes, sumado al hecho de que los insectos provenientes de zonas no fumigadas pueden desplazarse

y reocupar las zonas fumigadas si el proceso se discontinúa (Petherick, 2010). La supresión de la transmisión vectorial en algunos países como Brasil ha permitido que las otras formas de transmisión cobren relevancia (Coura, 2006; Coura y col., 2002).

III.1.3 Etapas de la enfermedad y tratamiento

El ciclo de la enfermedad se desarrolla en 2 etapas características: la etapa aguda que dura entre 4 y 8 semanas y en la cual el parásito se detecta en sangre, y una posterior etapa crónica de baja parasitemia (número de parásitos en el torrente circulatorio). La fase aguda se caracteriza por ser asintomática en el 95 % de los casos pero en ocasiones se presentan cuadros febriles y hepatoesplenomegalia (inflamación del hígado y del páncreas), entre otros síntomas; todos ellos son inespecíficos y no pueden asociarse fácilmente con la infección. En personas inmunodeprimidas o con problemas cardíacos, se presentan cuadros de miocarditis y meningoencefalitis que llevan a la muerte en un 5 – 10 % de estos casos. Si la enfermedad se adquiere por vía oral, la fase aguda es más severa, con múltiples afecciones digestivas además de las cardíacas, y tiene alta mortalidad (35 %). En la etapa crónica entre el 30 y 40 % de los infectados desarrollan síntomas, principalmente miocardiopatías, dilatación patológica del esófago o del colon por anidación del parásito en estos órganos (megaesófago y megacolon), alteraciones neurológicas o una combinación de las anteriores (Pecoul y col., 2016). La afección más común es la cardiopatía y sólo un 10 – 15 % de los pacientes sintomáticos desarrollan afecciones digestivas. Los síntomas dependen de la genética del hospedador y de la cepa de *T. cruzi* ya que éstas presentan tropismo por diferentes tejidos (Alarcón de Noya y col., 2010; Andrade y Andrews, 2005; Rassi y col., 2010).

Actualmente no existe vacuna para combatir la infección por *T. cruzi* aunque si hay disponibles 2 drogas para su tratamiento, nifurtimox (Bayer) y benznidazol (Roche), que han sido lanzadas al mercado hace unos 50 años. Las mismas sólo son efectivas en el 50 % de las infecciones siempre que se administren durante la fase aguda de la enfermedad, en casos de Chagas congénito o en casos crónicos de pacientes jóvenes, menores de 14 años, que completen los 60 días de tratamiento. Este tratamiento es prolongado y presenta también severos efectos secundarios, como dermatitis, anorexia, insomnio, vómito, náuseas y neuropatías, lo que contribuye a que

los pacientes lo discontinúen (Clayton, 2010; Rassi y col., 2010; Schofield y col., 2006). Asimismo, aún no se ha demostrado la efectividad del tratamiento para combatir la progresión de los cuadros clínicos en individuos crónicos. Se calcula que unas 40 mil personas cada año morirán por esta enfermedad en los próximos años, no habiendo un tratamiento efectivo para ellas (Machado-de-Assis y col., 2013; Morillo y col., 2015).

III.1.4 Impacto

Además de los compuestos mencionados usados para la enfermedad de Chagas, pocos fármacos fueron ensayados en pacientes chagásicos. La industria farmacéutica, a nivel mundial, no promueve avances en el desarrollo de nuevos compuestos para la cura de esta enfermedad, que afecta principalmente a personas de bajos recursos y se la considera por ello una más de la lista de enfermedades tropicales olvidadas o desatendidas¹, junto con la malaria, la lepra y el dengue.

En consecuencia, esta enfermedad constituye un impacto económico considerable para los gobiernos latinoamericanos que soportan los altos costos de tratamiento de pacientes, además de la fumigación con insecticidas para controlar el vector -que representa un costo menor-. Por otro lado, la enfermedad se caracteriza por desarrollarse lentamente sin diagnóstico en la mayoría de los casos, acarreando gastos que no se asocian directamente a la enfermedad (Lee y col., 2013).

Por todo lo anterior, La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a esta tripanosomiasis una enfermedad relevante y promueve la generación de nuevas estrategias y herramientas para su diagnóstico, tratamiento y atención médica. El monitoreo de la sangre es obligatorio para prevenir el contagio por transfusión sanguínea y/o trasplante de órganos. Además, se sugiere el diagnóstico de la infección en embarazadas y sus parientes cercanos (WHO; Fact sheet N°340, Marzo de 2017, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>).

Frente a este escenario, resulta primordial avanzar con las investigaciones y profundizar el conocimiento sobre la biología de *T. cruzi*, revelando en detalle los mecanismos de infección y supervivencia así como las distintas vías metabólicas del parásito. Este conocimiento posibilitará la identificación de blancos terapéuticos y el descubrimiento o diseño de nuevas moléculas con potenciales propiedades

¹ Son aquellas enfermedades infecciosas, la mayoría parasitarias, que proliferan en entornos empobrecidos, especialmente en el ambiente caluroso y húmedo de los climas tropicales (OMS, 2010).

antiparasitarias que requieran tiempos de tratamiento más cortos y menos efectos secundarios.

III.2 *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi es un protista perteneciente a la familia *Trypanosomatidae*², dentro de la clase de los kinetoplástidos (*Kinetoplastidae*) (Atías, 2003). Se caracterizan por la presencia de un solo flagelo que les proporciona movilidad y una única mitocondria de gran tamaño cuyo ADN se encuentra compactado cerca de la base del flagelo en una estructura denominada *kinetoplasto* (de Souza, 2009). Son organismos heterótrofos, se multiplican por fisión binaria y todas las especies conocidas hasta el momento son parásitos que pueden tener ciclos de vida simples (con un solo huésped), o complejos (o digenéticos), que comprenden varias etapas diferenciadas en dos huéspedes. Algunas especies causan enfermedades en humanos y animales, como *Trypanosoma brucei* causante de la tripanosomiasis africana (o enfermedad del sueño) transmitida por la mosca tse-tsé del género *Glossina*, y diferentes especies de *Leishmania* causantes de leishmaniasis transmitida por moscas de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*. Otras especies como *Trypanosoma vivax* infectan a ganado y animales silvestres y las especies del género *Phytomonas* infectan plantas (Atías, 2003).

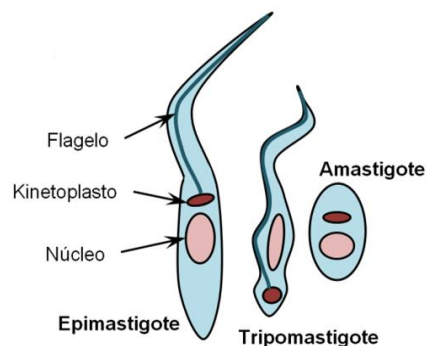
III.2.1 Ciclo de vida

T. cruzi en particular presenta un ciclo de vida complejo o digenético, alternando entre hospedadores vertebrados y un insecto hematófago vector responsable de su transmisión. Se pueden identificar al menos tres estadios bien definidos: epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes (Figura 2) (de Souza, 2009), que poseen características morfológicas y metabólicas diferenciadas como consecuencia de su adaptación al ambiente dentro de cada hospedador. Los estadios de epimastigote y amastigote son formas replicativas no infectivas. Los primeros son móviles y extracelulares, de aspecto fusiforme, mientras que los segundos son intracelulares, de forma redondeada y carecen de flagelo visible, por ende no presentan movilidad (en éstos, el flagelo se localiza intracelularmente en una bolsa flagelar que es distinguible por microscopía electrónica). Los tripomastigotes son

² En el género *Trypanosoma*, *trypano* (taladro) y *soma* (cuerpo) hace referencia al movimiento que describen al desplazarse.

móviles, infectivos y no se replican, también poseen forma alargada y resultan de la diferenciación de las formas replicativas anteriores (tripomastigote metacíclico y sanguíneo, respectivamente).

Figura 2. Estadios del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Los epimastigotes tienen 20 - 40 μm de largo con el kinetoplasto en la parte anterior y un núcleo redondeado. Los tripomastigotes (sanguíneos o metacíclicos) tienen 25 μm de largo con el kinetoplasto en la parte posterior y un núcleo alargado centrado en el cuerpo. En epimastigotes y amastigotes el kinetoplasto tiene forma de barra y se encuentra perpendicular al eje del flagelo, mientras que en tripomastigotes tiene forma redondeada; en todos los casos se localiza cerca del cuerpo basal del flagelo y hay una estructura que lo conecta con él (Adaptado de de Souza, 2002, 2009).



Su ciclo de vida (Figura 3) comienza cuando un insecto ingiere sangre de un hospedador infectado tomando tripomastigotes que circulan en el torrente sanguíneo. Al enfrentarse a componentes de la saliva y enzimas digestivas, así como a grandes cambios de temperatura, osmolaridad y suministro de nutrientes, los tripomastigotes comienzan su diferenciación a epimastigote la cual se completa en el estómago del insecto. Al ingresar al intestino de éste enfrentan un estrés nutricional, condiciones ambientales que determinan que el parásito vuelva a diferenciarse a una forma infectiva, el tripomastigote metacíclico, durante su migración hacia la parte posterior del recto del insecto (de Souza y col., 2010; Tyler y Engman, 2000, 2001). Tras una nueva ingesta de sangre a partir de otro hospedador, el insecto defeca inmediatamente depositando las formas infectivas del parásito, el cual podrá ingresar al torrente sanguíneo del nuevo organismo a través de la herida de la picadura. Una vez allí, invade células nucleadas donde se diferencia a amastigote, la forma replicativa intracelular. Luego de 9 divisiones celulares, los amastigotes se diferencian nuevamente a tripomastigotes que adquieren movilidad y abandonan la célula produciendo la lisis celular. Los tripomastigotes quedan nuevamente en circulación, siendo capaces de infectar otras células nucleadas del mismo organismo o de ser ingeridos por otro insecto hematófago reiniciando el ciclo de la infección (Andrade y Andrews, 2005; de Souza, 2002, 2009; de Souza y col., 2010; Tyler y Engman, 2001).

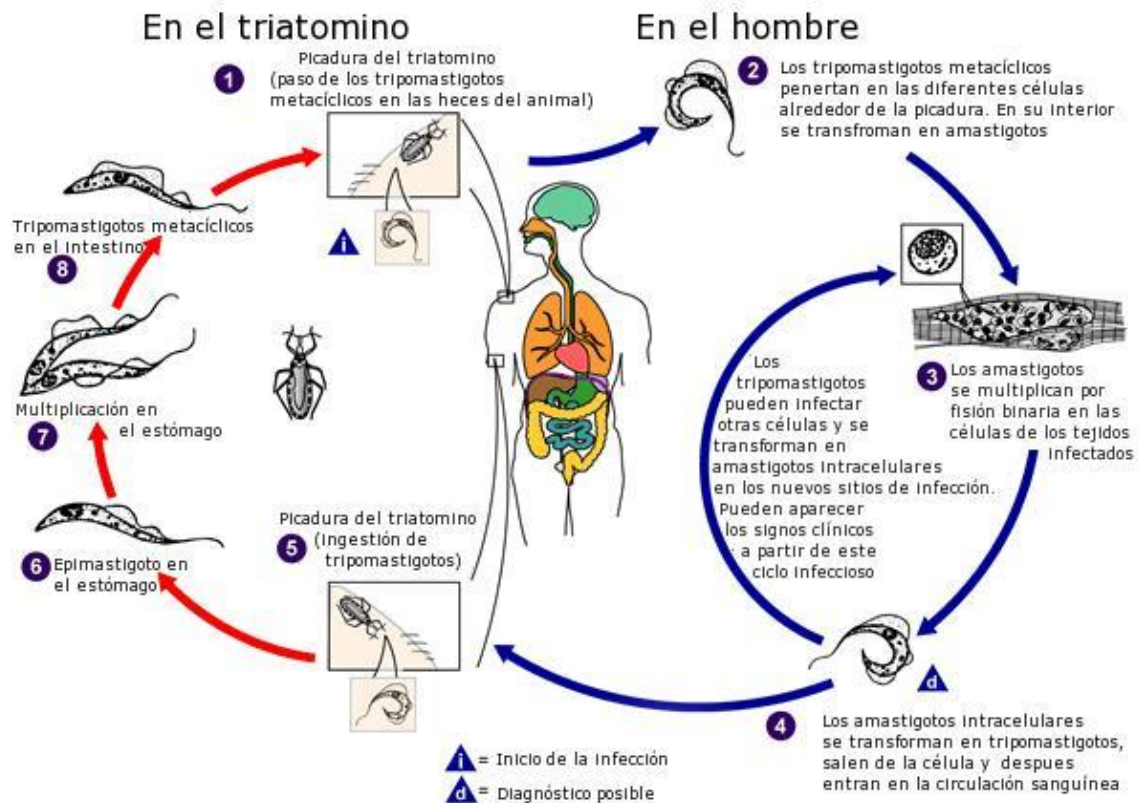


Figura 3: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* con los estadios que adopta en sus diferentes hospedadores insectos y vertebrados. Adaptado de <http://www.dpd.cd.gov/dpdx>.

Los estadios dentro del hospedador son los relevantes para el estudio de la infección (en especial el estadio de amastigote que es la forma replicativa y la que permanece latente durante años). Sin embargo, la mayoría de los estudios se han realizado sobre el estadio de epimastigote que puede mantenerse fácilmente en condiciones de cultivo (Camargo, 1964; Tyler y Engman, 2001). En los laboratorios de investigación este estadio se mantiene de rutina en cultivos axénicos y a partir de estos se obtienen los estadios de tripomastigote y amastigote, *in vitro* o infectando animales de laboratorio (De Lima y col., 2008; Schuster y Sullivan, 2002).

III.2.2 Estructura celular

T. cruzi es un organismo eucariota unicelular que presenta una organización celular clásica con organelas típicas y, además, algunas estructuras características de los tripanosomátidos (Figura 4) (de Souza, 2008). La **superficie celular** se compone de una membrana plasmática, sin pared celular. Por debajo de ésta se encuentra el citoesqueleto compuesto por una capa de microtúbulos subpeliculares, característica de la familia *Trypanosomatidae*, que envuelven casi por completo el volumen celular.

Son los responsables de la rigidez de la célula, volviéndola resistente a la ruptura por medios mecánicos. El **flagelo** nace de una invaginación llamada bolsillo flagelar, que es una zona especializada de la membrana carente de microtúbulos y con alta actividad endocítica y exocítica. Es esencial para la viabilidad, movilidad y patogénesis. Como ya se mencionó, poseen una sola **mitocondria** ramificada que se extiende a lo largo de todo el cuerpo celular, y en una zona especializada de la matriz mitocondrial se encuentra el **kinetoplasto**. Este se conecta al cuerpo basal del flagelo por lo que su posición en la célula define el lugar donde se origina el flagelo. El ADN del kinetoplasto está formado por dos tipos de ADN circulares conocidos como minicírculos y maxicírculos y representa el 20 - 25 % del ADN de la célula. Codifica para los ARNr y los ARNm de algunas de las subunidades de los complejos de la cadena respiratoria, pero la mayoría de las proteínas mitocondriales son de codificación nuclear y se importan a la mitocondria vía un péptido señal de 6 a 8 aminoácidos normalmente combinando serina, leucina y aminoácidos básicos (de Souza, 2009; de Souza y col., 2009). El **núcleo** es pequeño, ligeramente esférico en epimastigotes y amastigotes, y alargado en tripomastigotes; se localiza en el centro de la célula. El genoma nuclear es de 43 – 50 Mpb distribuido entre 30 a 40 cromosomas de 0,45 - 4 Mpb cada uno, lo que se corresponde con más de 10.000 genes codificantes para proteínas por genoma haploide (de Souza, 2002). Entre otras organelas típicas de tripanosomátidos se encuentran los **glicosomas**, de forma esférica, son peroxisomas especializados que contienen las enzimas involucradas en las primeras 7 reacciones de la glucólisis (que producen 3-fosfoglicerato a partir de glucosa). Además, carecen de catalasas y contienen más de 50 enzimas involucradas en diversas vías metabólicas (gluconeogénesis y ciclo de las pentosas fosfato, β -oxidación de ácidos grasos, síntesis de ésteres de fosfolípidos, salvataje de purinas y biosíntesis de pirimidinas). Los **reservosomas** son compartimentos ácidos presentes sólo en epimastigotes que se ubican en la parte posterior de la célula. Allí se degradan principalmente proteínas, y se acumulan lípidos (Cunha-e-Silva y col., 2006; de Souza, 2009; Sant'Anna y col., 2004). Los **acidocalcisomas** son organelas ácidas que contienen polímeros lineales de ortofosfato (fosfatos unidos por enlaces fosfoanhidro de alta energía), pirofosfato y fosfato. Los polifosfatos parecen ser el fosfato de alta energía más abundante en *T. cruzi*. Además, se acumulan iones de calcio, magnesio, sodio, potasio, zinc y

compuestos fosforados. Están involucrados en la homeostasis de pH y en la osmoregulación (de Souza, 2002). Por último, poseen una **vacuola contráctil** central cerca del bolsillo flagelar que, de manera similar a los acidocalcisosmas, participa en la osmorregulación (de Souza, 2009).

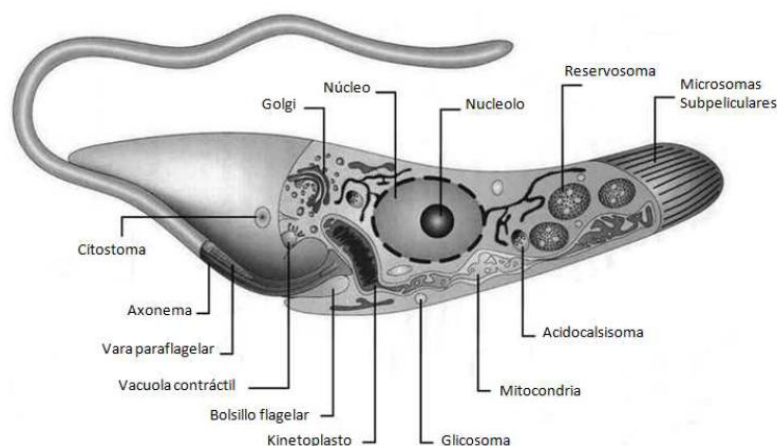


Figura 4. Representación de un epimastigote de *Trypanosoma cruzi*. Se muestran las organelas típicas de célula eucariota y algunas típicas de tripanosomátidos (Adaptado de de Souza, 2008).

III.2.3 Metabolismo

Los tripanosomátidos, por ser parásitos, dependen metabólicamente del hospedador. *T. cruzi*, en sus distintos estadios, presenta variaciones en su metabolismo como consecuencia de la adaptación a la disponibilidad de nutrientes en cada hospedador. Por ejemplo, varía su preferencia por distintas fuentes de carbono: los epimastigotes son capaces de metabolizar tanto glucosa como aminoácidos pero tienen preferencia por la primera. Los medios de cultivo que son utilizados para el crecimiento de epimastigotes *in vitro*, que son LIT (*Liver Infusión Tryptose*) y BHI (*Brain Heart Infusión*), contienen glucosa como fuente de carbono (Camargo, 1964; Warren, 1960). Los tripomastigotes metacíclicos poseen un catabolismo no glucolítico, ya que degradan proteínas y aminoácidos para utilizarlos como fuentes de carbono (Cazzulo, 1992). En el estadio de amastigote la disponibilidad de glucosa disminuye y el metabolismo pasa a depender de la degradación de lípidos, mientras que la glucosa es obtenida de la gluconeogénesis (Atwood y col., 2005). En sangre, los tripomastigotes circulantes dependerían de glucosa, dado que expresan un transportador específico.

T. cruzi no acumula polisacáridos de reserva y utiliza la glucólisis y el ciclo de Krebs, que ocurren en el glicosoma y en la mitocondria respectivamente, para la degradación de las diferentes fuentes de carbono. El succinato es el principal producto

de degradación seguido luego por la alanina; ambos metabolitos se producen consumiendo el poder reductor en la célula mediante procesos de fermentación (Bowman y col., 1963). A pesar de tener un metabolismo fermentativo, *T. cruzi*, al igual que los demás tripanosomátidos, posee una cadena respiratoria mitocondrial por lo que no puede independizarse del consumo de oxígeno, lo que se conoce como metabolismo fermentativo aeróbico (Tielens y van Hellemond, 2009).

Otra de sus necesidades nutricionales la comprende la auxotrofia por diversos cofactores, entre ellos el grupo hemo, el cual también debe ser adicionado al medio de cultivo. Si bien históricamente se recomendaba utilizar una concentración de 20-30 μM de este compuesto (Camargo, 1964), hallazgos recientes en nuestro laboratorio indican que una concentración de 5-10 μM es suficiente para mantener el cultivo viable y en óptima proliferación, mientras que a concentraciones mayores a 30 μM se aprecian efectos tóxicos. Por esta razón, rutinariamente hemos mantenido los cultivos con hemina en concentración 20 μM , y actualmente utilizamos la menor concentración de 10 μM del cofactor.

III.3 La problemática de la adquisición de hemo en *T. cruzi*

III.3.1 Relevancia del grupo hemo

El hemo, también llamado protohemo IX o hemo B, es una molécula formada por un anillo denominado protoporfirina IX (PP IX) que coordina a través de cuatro átomos de nitrógeno a un ión ferroso central (Fe^{2+}) (Figura 5). El anillo tiene una estructura rígida debido a la presencia de enlaces conjugados que absorben radiación en la zona visible del espectro. La absorción cambia con la presencia de distintas cadenas laterales que dan lugar a las distintas formas de hemo.

El grupo hemo cumple un rol fundamental en muchos procesos celulares y en variedad de organismos dado que es cofactor de numerosas proteínas, denominadas hemoproteínas. A estas se une mediante enlaces no covalentes, donde el hierro se coordina generalmente a residuos de histidina, metionina o cisteína de la cadena polipeptídica (ligandos axiales). Alternativamente, se halla unido por enlaces covalentes del tipo tioéter, generalmente entre los 2 grupos vinilos de las cadenas laterales del anillo de PP IX y 2 residuos de cisteína de la proteína en cuestión, denominándose hemo C en este caso (Figura 5) (Warren y Smith, 2009). Las

hemoproteínas están involucradas en procesos como: el transporte de oxígeno (hemoglobina y mioglobina), en la cadena de transporte de electrones mitocondrial (los complejos II, III, IV y el citocromo c), metabolismo de drogas y esteroides (citocromos P450), transducción de señal (óxido nítrico sintasa, guanilato ciclasas solubles), transcripción y regulación de enzimas en la defensa antioxidante (NADPH oxidasa) y es también una molécula regulatoria, por mencionar algunas (Furuyama y col., 2007; Mense y Zhang, 2006).

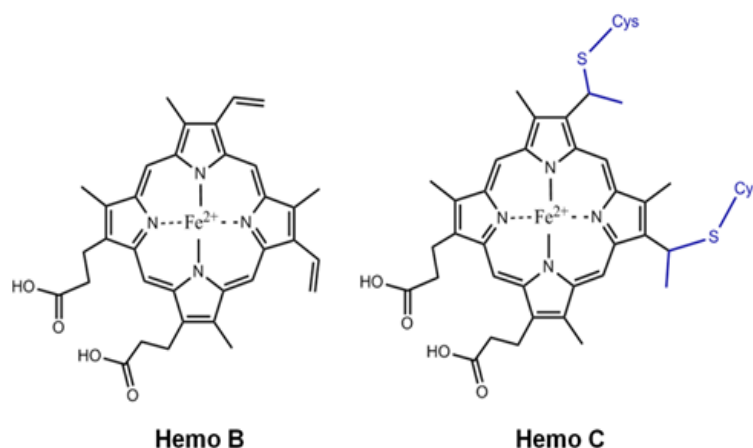


Figura 5. Representación esquemática de la estructura de la molécula de hemo. Existen distintas formas de hemo, todas ellas formadas por un anillo de protoporfirina IX coordinado a un ión de hierro; se diferencian entre sí por las cadenas laterales. El hemo B y C son las especies más abundantes en los distintos organismos y poseen como cadenas laterales 4 grupos metilos, 2 grupos vinilos y 2 grupos propiónicos; estos últimos suelen estar ionizados por lo que la molécula portando Fe^{2+} es eléctricamente neutra. En su forma libre, el anillo de PP IX del hemo B coordina Fe^{3+} , como resultado tiene una carga neta positiva y se le asocia un contraión, se lo denomina hemina.

La ruta biosintética de hemo B está presente en organismos aerobios, con algunas excepciones como los tripanosomátidos. Esta vía se encuentra altamente conservada a través de la evolución, tanto en procariotas como eucariotas, existiendo sólo diferencia en la síntesis del primer precursor, el ácido δ -aminolevulínico (δ -ALA). Las siguientes 7 reacciones son comunes a todos los organismos que poseen esta vía metabólica (los detalles de todos los pasos se abordan en secciones posteriores, Figuras 11b y 11c). Otra diferencia radica en la confinación a compartimentos de algunas de las enzimas involucradas, ya que en eucariotas ha sido influenciada por el proceso de endosimbiosis que ha dado origen a mitocondrias y cloroplastos. Es así que en eucariotas fotosintéticos la biosíntesis de hemo ocurre en el cloroplasto y en eucariotas no fotosintéticos comienza y termina en la matriz mitocondrial, pasando por varias etapas enzimáticas en el citosol (Dailey, 1990).

La capacidad del hemo de ser cofactor en funciones tan diversas se debe a que posee propiedades de óxido-reducción en su átomo central, así como propiedades hidrofóbicas en el anillo orgánico, que le permiten interaccionar con proteínas y lípidos. Estas mismas propiedades hacen que el hierro y las porfirinas sean altamente tóxicas para la célula ya que, el hemo libre puede generar especies reactivas del oxígeno (EROs), o producir un daño directo sobre diferentes componentes celulares al oxidar lípidos, agregarse en las membranas y alterar su permeabilidad, entrecruzar proteínas y dañar el ADN (Krishnamurthy y col., 2007; Kumar y Bandyopadhyay, 2005, Mense y Zhang, 2006). También se ha demostrado que interviene en procesos inflamatorios que aparecen en el curso de algunas enfermedades como arterioesclerosis, fallo renal y rechazo en trasplante de corazón. Por otro lado, la deficiencia de hemo afecta por ejemplo la diferenciación neuronal en ratas, causa el arresto del ciclo celular y apoptosis de células HeLa en cultivo, anemia y porfirias en humanos, y hasta podría ser responsable del deterioro mitocondrial y neuronal que acompaña al envejecimiento y enfermedad de Alzheimer (Mense y Zhang, 2006).

Por todo lo anterior, el nivel de hemo libre dentro de una célula se mantiene a niveles muy bajos, existiendo un control muy estricto de su biosíntesis, transporte y degradación en función de los requerimientos celulares (Furuyama y col., 2007; Ryter y Tyrrell, 2000; Chiabrando y col., 2014; Khan y Quigley, 2011). La presencia de numerosas proteínas que lo unen con alta afinidad también contribuyen a prevenir su efecto tóxico (Mense y Zhang, 2006).

El hemo C se obtiene tras la unión covalente del cofactor a la apoproteína citocromo *c* (Mavridou y col., 2013). Este proceso ocurre en el compartimento celular donde el citocromo cumplirá su función, previo transporte de ambos componentes por separado (hemo y apoproteína). La composición y características de los sistemas de biogénesis de citocromo *c* varían entre los distintos organismos y organelas; en líneas generales se clasifican en al menos 5 tipos (I al V) y participan sistemas de transporte, oxidorreductasas, chaperonas y proteínas de maduración (Mavridou y col., 2013).

Existe otra forma de hemo, el hemo A, que es cofactor únicamente de la enzima citocromo *c* oxidasa (CcO), último complejo en la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Es una forma minoritaria de hemo que difiere por tener un hidroxietilfarnesilo en el carbono 2 del anillo porfirínico en lugar de un grupo vinilo y

un formilo en el carbono 8 en lugar de un metilo (Figura 6) (Moraes y col., 2004; Hederstedt, 2012). La conversión de hemo B a hemo A ocurre a través de dos reacciones enzimáticas secuenciales (Figura 6): primero una farnesilación mediada por una hemo O sintasa (HOS o Cox10) (Puustinen y Wikstrom, 1991; Saiki y col., 1993), seguido de una oxidación por una hemo A sintasa (HAS o Cox15) (Brown y col., 2002; Hederstedt, 2012). En eucariotas, las enzimas HOS y HAS son proteínas integrales de la membrana interna mitocondrial pero se encuentran codificadas en el genoma nuclear (Glerum y col., 1997). Además ambas están altamente conservadas desde las levaduras hasta los organismos más complejos como los humanos (Zee y Glerum, 2006). Se cree que los sitios activos de ambas proteínas estarían orientados hacia el mismo lado de la membrana (matriz o espacio intermembrana mitocondrial), de manera que se produzca un intercambio directo del hemo O entre ambas proteínas. A raíz de ello, se ha propuesto que la transferencia del hemo O desde Cox10 a Cox15 constituya un posible punto de regulación, si bien tal interacción no ha podido ser comprobada en la mayoría de los organismos eucariotas (Mogi y col., 2009).

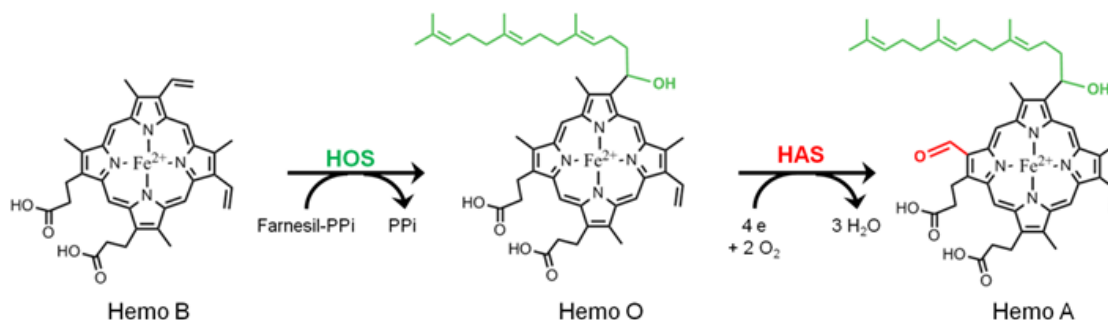


Figura 6: Esquema de la reacción de biosíntesis de hemo A a partir de hemo B catalizado por las enzimas HOS y HAS. En la primera reacción ocurre la adición de un grupo farnesilo a un grupo vinilo presente en el anillo pirrólico A del hemo B con formación del intermediario hemo O. La segunda reacción involucra la oxidación del grupo metilo del anillo D del hemo O a aldehído.

El hemo A es estructuralmente similar al hemo B, aunque con un mayor potencial de reducción, constituyendo también una molécula altamente tóxica (Hederstedt, 2012). Dado que el hemo A es cofactor de una única enzima, la CcO, su síntesis está regulada y acoplada al ensamblado de este complejo, a tal punto que deficiencias en su biosíntesis impiden el ensamblado correcto de la CcO, y en algunos organismos las subunidades del complejo serán posteriormente degradadas. Muchas afecciones en humanos causadas por deficiencias de hemo se deben en realidad a deficiencias de la CcO, como trastornos neurodegenerativos, afecciones metabólicas,

musculares, cardiopatías y otros, y pueden estar originados por mutaciones en los genes *COX10* y *COX15* (Antonicka y col., 2003a; Antonicka y col., 2003b; Valnot y col., 2000; Bugiani y col., 2005; Oquendo y col., 2004, Moraes y col., 2004; Zee y Glerum, 2006).

III.3.1.1 El hemo en *Trypanosoma cruzi*

El hemo es un cofactor esencial para *T. cruzi*, así como para otros tripanosomátidos debido a que carecen de una ruta de síntesis del cofactor. Sin embargo, poseen numerosas hemoproteínas, muchas de las cuales son esenciales a lo largo de su ciclo de vida, como las de la cadena respiratoria mitocondrial (Korený y col., 2010, Tripodi y col., 2011). Estudios bioquímicos han demostrado la presencia de hemoproteínas como los complejos II, III y IV pertenecientes a una cadena respiratoria mitocondrial activa en el estadio de epimastigote, con citocromos *aa3*, *b*, *c* y *o* como componentes del sistema de transporte de electrones y también una ATP sintasa (Stoppani y col., 1980; Affranchino y col., 1986). Además, los estudios reportados postulan que la respiración celular sería esencial durante todos los estadios del ciclo de vida del parásito (Silva y col., 2011; Merli y col., 2017).

En el citocromo *c* de tripanosomátidos, el hemo (hemo C) se encuentra unido covalentemente a la cadena polipeptídica a través de un solo enlace tioéter. Al momento no se ha determinado el sistema de maduración de citocromo *c*, aunque se cree presentarían un sistema completamente diferente a los ya descritos para otros organismos (Fulop y col., 2009). Respecto a la biosíntesis de hemo A, en nuestro laboratorio se identificaron las secuencias codificantes para las enzimas del tipo HOS y HAS en el genoma de *T. cruzi*, las cuales se denominaron *TcCOX10* y *TcCOX15*, respectivamente (Buchensky y col., 2010). La actividad HOS y HAS de los productos proteicos fue confirmada mediante ensayos de complementación en las correspondientes células *knock out* de *Saccharomyces cerevisiae* para los genes *COX10* y *COX15* (*cox10Δ* y *cox15Δ*, respectivamente). Adicionalmente, se demostró que los niveles de ARNm de *TcCOX10* y *TcCOX15* varían en los diferentes estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*, lo cual podría ser un indicador de los diferentes requerimientos respiratorios de *T. cruzi* a lo largo de su ciclo de vida. El estudio de TcCox15 fue parte del trabajo de Tesis Doctoral del Dr. M. L. Merli, mientras que TcCox10 fue objeto de

estudio de la Tesina de grado de la Lic. L. V. Ferrero (Ferrero, 2014) y se continuaron durante la presente Tesis. Los detalles de estos experimentos se detallan en la sección V.2.

III.3.2 Transporte de hemo

La homeostasis celular de hemo se logra a través de la regulación coordinada de la síntesis, transporte y degradación de esta molécula. Si bien existe una extensa descripción sobre las enzimas que intervienen en la biosíntesis de hemo y en su degradación, no se sabe con certeza cómo es luego transportado hacia sus respectivos blancos, incluyendo la descripción de su transporte a través de membranas de organelas.

Hasta hace algunos años, se aceptaba que el movimiento de hemo a través, y dentro, de las células ocurría libremente por medio de un mecanismo de difusión. Esta idea tenía su sustento en la naturaleza lipofílica de dicha molécula. Pero estas moléculas poseen grupos carboxilo como cadenas laterales que les confieren carga negativa, limitando su capacidad para difundir a través de las membranas y provocando su acumulación en las mismas, siendo esto altamente deletéreo para la célula. Por lo tanto, se requeriría de algún mecanismo, posiblemente dependiente de energía, para transportar al grupo hemo a través de membranas biológicas. A la fecha, es ampliamente aceptado entre los especialistas de la disciplina, que el transporte y distribución de hemo dependen de proteínas transportadoras de membrana para atravesar las bicapas lipídicas así como de proteínas transportadoras solubles o chaperonas (Hamza y Dailey, 2012).

La caracterización del transporte de hemo es un tópico que se encuentra más avanzado en organismos procariotas. Se han descrito distintos sistemas de transporte para especies bacterianas tanto Gram positivas como Gram negativas, en donde participan varios transportadores de membrana del tipo ABC (del inglés, *ATP-binding cassette*) (Anzaldi y Skaar, 2010; Wandersman y Delepelaire, 2004). En eucariotas, se han identificado en los últimos años algunas proteínas transportadoras de membrana que podrían, *in vivo*, actuar como transportadores de hemo (Hamza y Dailey, 2012). Muchas de ellas son también del tipo ABC pero aún no se ha completado ningún modelo de transportador ni se han identificado todas las proteínas que participarían.

A continuación se enumeran algunas de las proteínas que intervendrían en el transporte de hemo en organismos eucariotas que han sido descritas hasta la fecha (Figura 7):

El gusano del suelo *Caenorhabditis elegans* es uno de los eucariotas en los que más se ha estudiado el metabolismo de hemo. Se identificaron 288 genes en su genoma cuya transcripción responde a cambios en la concentración de hemo (HRG, por *heme responsive genes*) (Severance y col., 2010). De éstos, 4 fueron estudiados en profundidad y fue posible asignarles una función, incluyendo los que codifican para las proteínas CeHRG-1 y CeHRG-4, los primeros importadores de hemo identificados en un organismo eucariota. Dado que *C. elegans* es incapaz de sintetizar hemo, estas proteínas son esenciales para la incorporación del cofactor a partir de la dieta (Rao y col., 2005). CeHRG-1 y CeHRG-4 son proteínas con 4 hélices transmembrana (son parálogos entre sí); CeHRG-4 mediaría la importación de hemo en la membrana plasmática y CeHRG-1 regularía la disponibilidad de hemo en los compartimentos endosomales. CeHRG-1 posee ortólogos en vertebrados incluidos los humanos (hHRG-1, que se ubica en compartimentos endosoma-lisosomales), mientras que CeHRG-4 parece ser específico del gusano (Rajagopal y col., 2008; Yuan y col., 2012). CeHRG-2 es una proteína con una única hélice transmembrana y participaría en la homeostasis de hemo en tejido hipodérmico extraintestinal, se expresa en retículo endoplásmico (RE) y membrana plasmática (Chen y col., 2012). CeHRG-3 sería la responsable de llevar hemo desde el intestino a los embriones (transporte intercelular) (Chen y col., 2011).

Otros transportadores descritos con función de importación de hemo en células de mamíferos son HCP1 y FLVCR2. HCP1 (por *heme carrier protein*) se ubica en la membrana de enterocitos del duodeno y podría estar implicada en la absorción de hemo en el intestino, similar a CeHRG-4 en *C. elegans* (Shayeghi y col., 2005). Estudios posteriores indican que su ligando fisiológico sería el folato y que, la anemia provocada por la ausencia de HCP1 sería un efecto secundario por la deficiencia de ácido fólico y no por mala absorción de hemo (Qiu y col., 2006). FLVCR2 (Receptor de tipo 2 del virus de la leucemia felina subgrupo C) es un transportador posiblemente implicado en la importación de hemo que se encuentra ampliamente difundido en los tejidos humanos, incluyendo hígado fetal, cerebro y riñón (Duffy y col., 2010), aunque no se descarta que en realidad actúe como exportador. Por último, en el hongo patógeno

Candida albicans se describió que las proteínas ancladas a membrana Rbt51 y Rbt5 actuarían como receptores de hemo y hemoglobina que luego son incorporados por endocitosis (Weissman y col., 2008).

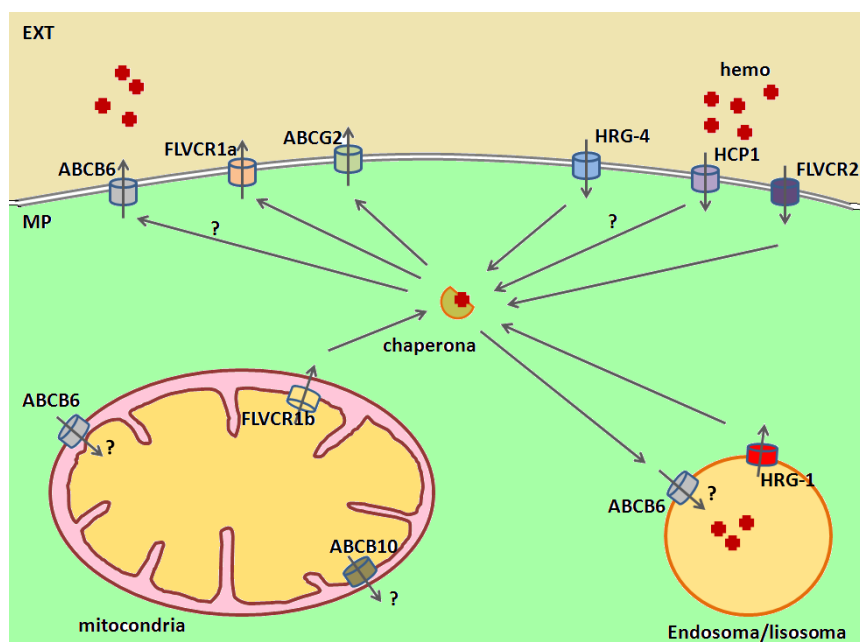


Figura 7. Descripción esquemática de posibles transportadores de hemo identificados en células eucariotas. El hemo puede ingresar al interior de la célula a través de los importadores HRG-4, HCP1 o FLVCR2. Los transportadores de superficie FLVCR1a y ABCG2 mediarían la exportación hacia el exterior celular, mientras que la isoforma mitocondrial FLVCR1b lo transportaría hacia el citosol. Se ha propuesto que ABCB6 es un importador de hemo mitocondrial, además ha sido localizado en membrana plasmática y vesículas endosoma/lisomales. No está claro si ABCB10 transporta hemo en la mitocondria. La chaperona responsable de unir hemo para el tráfico intra- y/o intercelular del cofactor aún no ha sido identificada. Los signos de interrogación (?) representan vías de tráfico presuntas. EXT, exterior celular; MP, membrana plasmática. Adaptado de Yuan y col., 2013.

La detoxificación de hemo se produce principalmente por la acción de las enzimas hemo oxigenasas (HO) que degradan el hemo en exceso en el interior de las células. La exportación de hemo puede ser una estrategia de detoxificación adicional para evitar que éste se acumule en demasía. Por ejemplo, en células como los macrófagos que fagocitan unos 360 millones de glóbulos rojos (GR) senescentes y reciclan 25 mg de hierro por día, se libera al citosol gran cantidad de hemo, parte de la cual no llegaría a ser degradada por la HO. En estas condiciones la opción de exportarlo se vuelve necesidad. A tal fin se han descrito algunos transportadores que pueden actuar como exportadores de hemo, por ejemplo, FLVCR1a y ABCG2. FLVCR1a tiene un alto grado de homología con FLVCR2 pero, a diferencia de éste, sólo ha sido localizado en la superficie de células hematopoyéticas y estaría ausente en hígado fetal, páncreas y riñón (Quigley y col., 2004; Keel y col., 2008). Se postula que actuaría en macrófagos

tras la fagocitosis de GR senescentes y al parecer sería 100 veces más eficiente como exportador de hemo en presencia de hemopexina, una proteína del suero con alta afinidad por el hemo (Yang y col., 2010). Además, una isoforma mitocondrial de menor tamaño, FLVCR1b, parece ser responsable del transporte de hemo desde el interior de la organela al citosol (Chiabrando y col., 2012). El segundo exportador de hemo de mamíferos identificado es ABCG2, de la familia de proteínas ABC (Krishnamurthy y Schuetz, 2005). Éste se expresa ubicuamente en variedad de tejidos, incluyendo células madre hematopoyéticas y células eritroides. Si bien tendría una función redundante con FLVCR1a, al parecer la especificidad de sustrato de ABCG2 es menor y puede exportar tanto porfirinas como compuestos no porfirínicos. Además, evidencias experimentales avalan que ABCG2 transferiría el hemo transportado a proteínas de unión extracelulares como albúmina (Desuzinges-Mandon y col., 2010).

III.3.2.1 Transporte de hemo en la mitocondria

En cuanto al tráfico intracelular de hemo, en particular el que ocurre a través de las membranas mitocondriales de eucariotas, constituye un tópico de estudio en la actualidad. Esta organela tiene un potencial de membrana altamente negativo, por lo que el transporte de compuestos negativamente cargados como las porfirinas requiere energía. En la mitocondria se localizan transportadores de tipo ABC, algunos de los cuales estarían vinculados al transporte de hemo y a la homeostasis de porfirinas. A pesar del origen endosimbiótico de la mitocondria, los transportadores ABC en esta organela son reducidos en número e inusuales y no tienen homólogo en procariotas (Burke y Ardehali, 2007). En organismos eucariotas superiores, hasta la fecha, se han identificado 4 transportadores mitocondriales de tipo ABC (Figura 8): ABCB6, ABCB7/Atm1, ABCB8 y ABCB10/Mdl1 (Zutz y col., 2009; Yuan y col., 2013), siendo todos de codificación nuclear. ABCB6, también llamado mtABCB3, estaría implicado en la biosíntesis y el transporte mitocondrial de porfirinas. Esta proteína de 79 kDa se localiza en la membrana mitocondrial externa y se expresa en altos niveles en tejidos que tienen altos requerimientos de hemo (células hepáticas, eritrocitos, músculo esquelético) (Krishnamurthy y col., 2006). Se ha demostrado que la cantidad de ABCB6 depende directamente de la cantidad intracelular de PP IX. Por medio de ensayos de unión a una resina de hemina-agarosa se determinó que es capaz de unir hemo, y esta

interacción es interrumpida por la presencia de coproporfirina III y en menor medida por hemina (Krishnamurthy y col., 2006). La forma reducida de la coproporfirina III, el coproporfinógeno III (COPRO III), es el último precursor citosólico de la biosíntesis de hemo y debe retornar a la matriz mitocondrial para completar la ruta biosintética (Rebeiz y col., 1996). Además, el dominio C-terminal de ABCB6, donde se encuentra el sitio de unión a nucleótido, está expuesto al citosol; esto apoya su función propuesta como importador mitocondrial (Krishnamurthy y col., 2006; Paterson y col., 2007). Si bien las evidencias experimentales iniciales llevaron a proponer que era el ortólogo en mamíferos de Atm1, el exportador de centros Fe-S de *S. cerevisiae* con el que comparte una homología de secuencia del 30 %, la capacidad de ABCB6 de complementar la función de Atm1 resultó ser sólo parcial. Actualmente se considera que ABCB6 y Atm1 no presentan homología de función y se postula que el rol de ABCB6 es importar COPRO III al interior de la mitocondria, paso necesario para la ruta de biosíntesis de hemo. Otras posibles funciones que se le adjudican no están relacionadas a la homeóstasis de hemo, como la de mediar la resistencia a multidroga en células cancerosas, dado que se observó una mayor expresión de esta proteína en células tumorales con resistencia aumentada a agentes citotóxicos (Szakács y col., 2004). Si bien es la única proteína ABC conocida que localiza en la membrana externa de mitocondrias, carece de una secuencia de direccionamiento mitocondrial. De hecho, existen reportes que la localizan también en la vía de secreción, incluyendo la membrana del RE, el aparato de Golgi y la membrana plasmática (Paterson y col., 2007; Tsuchida y col., 2008). Se desconoce la razón para esta localización dual, aunque se han presentado evidencias de que en Golgi transportaría compuestos porfirínicos (como el Foscan, una droga utilizada en terapia de ciertos tipos de cáncer), lo que permite relacionarlo con la resistencia a multidroga (Tsuchida y col., 2008). Otros estudios han propuesto una localización en compartimentos endo-lisomales y membrana plasmática de eritrocitos (Kiss y col., 2012). Por último, una isoforma de mayor tamaño (104 kDa) ha sido localizada en membrana plasmática de células de mamífero en cultivo, en este caso presentaría actividad transportadora hacia el exterior y específica para otro compuesto tetrapirrónico, la feoforbida A (Paterson y col., 2007). Estas evidencias permiten postular una función protectora frente a los efectos tóxicos de este compuesto que se encuentra muchas veces en los alimentos.

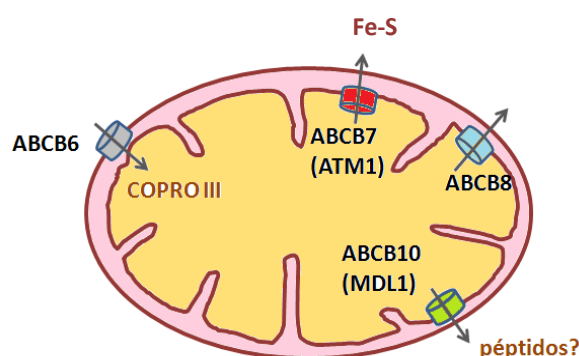


Figura 8. Esquema de los transportadores tipo ABC identificados en mitocondrias de células eucariotas. En mamíferos, se encuentran ABCB6, ABCB7, ABCB8 y ABCB10. En levaduras sólo Atm1 (homólogo a ABCB6 y ABCB7) y Mdl1 y Mdl2 (homólogos a ABCB8 y ABCB10). Todos los transportadores mitocondriales pertenecen a la subfamilia B (MDR/TAP) de transportadores ABC.

Los otros 3 transportadores mitocondriales tipo ABC se localizan en la membrana mitocondrial interna y tendrían una función como exportadores. ABCB7 de mamíferos es el verdadero ortólogo de Atm1 de levaduras, el primer transportador mitocondrial de tipo ABC (ATM = *A*bc *t*ransporter of *m*itochondria) en ser identificado (Leighton y Schatz, 1995). ABCB7 presenta aproximadamente un 50 % de identidad de secuencia con Atm1, y su expresión en levaduras *atm1Δ* es capaz de restaurar por completo el fenotipo silvestre de estas células (los detalles del fenotipo mutante se profundizarán en la sección V.1) (Csere y col., 1998). ABCB7 ha sido detectada en todos los tejidos analizados de ratón y humano, con un mayor nivel de expresión en el tejido muscular de humanos (Savary y col., 1997; Pondarre y col., 2006). Defectos de ABCB7 en humanos provocan una deficiencia en la maduración de centros Fe-S citosólicos (Bekri y col., 2000). Asimismo, se observó que la ausencia de ABCB7 en células HeLa en cultivo causan la acumulación de hierro en la mitocondria y su deficiencia en el citosol, además de una mayor sensibilidad a agentes oxidantes, y acumulación de PP IX en la mitocondria (Cavadini y col., 2007). Además de su función en la biogénesis de proteínas con centros Fe-S, se ha propuesto que presentaría un rol en el metabolismo de hemo (Pondarre y col., 2007). Se ha demostrado que interacciona con la ferroquelatasa (FeCH), la enzima responsable del último paso en la síntesis de hemo que ocurre en la matriz mitocondrial, esto es, la incorporación de hierro (Fe^{2+}) al anillo de PP IX (Taketani y col., 2003). En conjunto, los resultados anteriores sugieren que ABCB7 estaría involucrado en la regulación de la incorporación de hierro al hemo y a centros Fe-S así como en la homeostasis celular de hierro.

La proteína ABCB10 de humanos (o mABCB2; ABCme en ratones) fue detectada en la mayoría de los tejidos analizados, siendo más abundante en la médula ósea; algo similar se ha observado en ratones (Zhang y col., 2000). Se ha demostrado que su

presencia es esencial para la eritropoyesis (Hyde y col., 2012) y, más específicamente, que estimula la síntesis de hemo; a su vez este cofactor reprime la expresión de *AbcB10*, sugiriendo alguna función en la homeostasis de hemo. No se ha determinado con exactitud la identidad de su sustrato natural, pero se postula que sería una porfirina (Shirihai y col., 2000). Asimismo, se ha propuesto que poseería un posible rol en exportar el δ -ALA producido en la matriz mitocondrial (Bayeva y col., 2013). Estudios más recientes han mostrado que interactuaría con la mitoferrina (MFRN1) y con la FeCH estabilizando el complejo formado entre ellas en el *metabolon*³ del que forman parte (Chen y col., 2010). La MFRN1 es un transportador de hierro mitocondrial específico de células eritroides, cuya actividad es necesaria para la síntesis de hemo. La asociación de FeCH con MFRN1 permitiría acoplar la importación de hierro a la mitocondria con la incorporación del mismo al anillo de PP IX para producir hemo. Mediante ensayos de purificación por cromatografía de afinidad seguido de espectrometría de masas se identificaron otros transportadores de porfirinas, incluyendo ABCB6, así como la enzima PPOX (protoporfirinógeno oxidasa, responsable de la síntesis de PP IX, sustrato de la FeCH), todas ellas formando parte del mismo *metabolón* (Medlock y col., 2015).

Por último, se ha descrito la existencia de la proteína ABCB8 (o mABC1) de 60 kDa, cuyo transcripto se detectó en todos los tejidos humanos analizados (Hogue y col., 1999). Mediante ensayos de coimmunoprecipitación se demostró que, en condiciones no reductoras, forma parte de un complejo de más de 200 kDa en el que también participan otras proteínas mitocondriales, como la succinato deshidrogenasa, el *carrier* de fosfato inorgánico, el translocador de adenina y la ATP sintasa (Ardehali y col., 2004). Tales interacciones fueron confirmadas por ensayos de doble-híbrido. Este complejo macromolecular incorporado en proteoliposomas es capaz de transportar iones potasio (K^+), y por ello se cree que formaría una canal mitocondrial para K^+ involucrado en proteger a las células de miocardio del estrés oxidativo (Ardehali y col., 2005). Sin embargo, el mecanismo de acción y la organización de este canal son desconocidos y por lo tanto, la función de ABCB8 aún no está clara.

³ complejo intracelular de enzimas que forman parte de una misma vía metabólica y permite canalizar la transferencia de sustrato entre ellas

En eucariotas fotosintéticos, además de los transportadores mitocondriales mencionados existen otros particulares del taxón que no son objeto del presente trabajo de Tesis. Entre ellos se encuentran la familia Sta, cuyos miembros son homólogos a Atm1, y el transportador CcmB, homólogo a la proteína de igual nombre en *E. coli*. Para más información se sugiere el trabajo de Burke y Ardehali (2007) y las referencias que allí se mencionan.

III.3.2.2 Proteínas citosólicas de unión a hemo

Hasta la fecha, no se ha identificado proteína alguna que pueda actuar como chaperona en el tráfico intracelular de hemo, dejando un interrogante abierto acerca de cómo este cofactor es distribuido entre las hemoproteínas blanco. Numerosas proteínas citosólicas parecen unir hemo en mayor o menor medida, lo cual contribuiría a mantener el hemo libre en concentraciones mínimas. Algunos ejemplos reportados son las GSTs (glutación S-transferasas), las HBPs (por *heme binding protein*) -de mayor afinidad que las primeras-, y las FABPs (*fatty acid binding protein*), proteínas de unión a ácidos grasos (Yuan y col., 2013; Hamza y Dailey, 2012). Recientemente se ha reportado que la GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), enzima de la glucólisis, tendría una función alternativa al regular la inserción de hemo en ciertas hemoproteínas (Hannibal y col., 2012).

III.3.2.3 Transporte intercelular

En eucariotas superiores existen interrogantes adicionales sobre cómo el hemo es redistribuido entre los distintos tejidos (Yuan y col., 2013). Las proteínas extracelulares que pueden unir hemo en mamíferos y colaborarían en este proceso son la hemopexina, la haptoglobina y la albúmina sérica humana (HSA) además de dos lipoproteínas de alta y baja densidad, todas secretadas al plasma sanguíneo para recuperar el hemo liberado tras la lisis de eritrocitos envejecidos. Otra proteína ya mencionadas es CeHRG-3 de *C. elegans*. Además, existe evidencia a favor de una vía de transporte de hemo intercelular en vertebrados que sería funcional al menos durante el desarrollo embrionario (revisado en Hamza y Dailey, 2012).

De manera análoga, aquellos parásitos que requieren hemo como cofactor y no pueden sintetizarlo, se deben valer de un sistema de transporte para adquirirlo a partir del huésped. A este grupo pertenecen los tripanosomátidos, cuyo mecanismo de

incorporación de hemo es en gran medida desconocido y el escaso conocimiento disponible es bastante reciente. En primer lugar, en *T. cruzi* se demostró la existencia de un sistema de transporte transmembrana que estaría asociado a la internalización de hemo libre desde el exterior, el cual se vería afectado negativamente ante la presencia de inhibidores de transportadores tipo ABC (Lara y col., 2007; Cupello y col., 2011). Además, se determinó que el transporte de este compuesto es inhibido por análogos de hemo, por lo que existiría algún mecanismo específico para porfirinas (Cupello y col., 2011). También, en nuestro laboratorio se observó que este proceso depende de ATP (resultados no publicados). Más tarde se logró identificar un posible transportador para el cofactor en membrana plasmática de *Leishmania amazonensis* (Huynh y col., 2012), proteína a la que se la denominó LHR1 y que presenta homología a CeHRG-4 de *C. elegans*. Algo similar se observó en *T. brucei*, organismo en el cual se identificó la proteína denominada TbHRG con homología a CeHRG-1 (Cabello-Donayre y col., 2016). Simultáneamente, en nuestro laboratorio se identificó en el genoma de *T. cruzi*, un gen homólogo al de *LHR1* codificante de la proteína que denominamos TcHTE (por *heme transport enhancer*). La misma se localiza en la estructura del bolsillo flagelar, sitio reportado como lugar donde ocurren los procesos de transporte no endocíticos en tripanosomátidos, y su expresión responde a variaciones de la disponibilidad de hemo en el medio de cultivo. Asimismo, la sobreexpresión del gen *TcHTE* en *trans* estimula la captación de hemo desde el exterior. Por ensayos de complementación en levaduras deficientes en la síntesis de hemo, se observó que esta proteína localiza en membrana plasmática y favorece la captación del cofactor presente en el medio de cultivo, permitiendo su crecimiento en concentraciones restrictivas de hemo y además, restaurando la capacidad respiratoria. Mediante ensayos de transporte realizados en los distintos estadios de *T. cruzi* se demostró que TcHTE estaría involucrada en la incorporación de hemo hacia el interior celular en los estadios replicativos de *T. cruzi* (Merli y Pagura y col., 2016). Sin embargo, TcHTE es una proteína pequeña (171 AA, 18 kDa) con sólo 4 hélices transmembrana y esto no sería suficiente para llevar a cabo el proceso de transporte de hemo. Las evidencias experimentales permiten proponer que estaría formando trímeros, posiblemente junto a otros actores como componentes adicionales del sistema (Pagura, resultados no publicados).

Respecto al tráfico y distribución intracelular, el conocimiento existente es casi nulo. Dado que varias hemoproteínas se sitúan en la única gran mitocondria del parásito, esta organela es la diana principal hacia donde debe ser dirigido el hemo tras ser adquirido desde el exterior. Recientemente, en *T. brucei* y *Leishmania major*, se identificaron proteínas transportadoras de membrana intracelulares del tipo ABC, con homología a Atm1 y las Mdl de levadura, y que serían específicas para hemo (Horáková y col., 2015; Martínez-García y col., 2016).

A pesar de los avances no se han identificado con certeza los transportadores responsables del transporte de hemo a través de la membrana plasmática como tampoco los responsables del transporte en organelas en este organismo patógeno.

Dada su ubicuidad en funciones de transporte tanto en organismos procariotas como eucariotas, a continuación, se describe brevemente las características de los transportadores ABC.

III.3.2.4 Transportadores de tipo ABC

La familia de transportadores tipo ABC se compone de un grupo amplio de proteínas integrales de membrana que median diversos procesos de transporte ATP-dependientes. Estructuralmente estas proteínas poseen cuatro unidades funcionales o dominios: dos dominios transmembrana (TMD, por *transmembrane domain*) hidrofóbicos, que atraviesan la membrana múltiples veces, y dos citosólicos, de unión a nucleótido (NBD, por *nucleotide-binding domain*), que unen e hidrolizan ATP (Locher, 2016). Estos dominios pueden ser unidades individuales, o estar los NBD y/o los TMD fusionados en un único polipéptido; además pueden combinarse formando homodímeros o heterodímeros (Figura 9). Cada TMD consiste típicamente de 6 regiones α -hélices (aunque pueden tener hasta 10), dando un total de 12 (o hasta 20) α -hélices por transportador y son el principal determinante de la especificidad de sustrato, sea que lo unen de manera directa o vía proteínas accesorias. El espectro de sustratos⁴ que pueden transportar es muy diverso e incluye desde moléculas inorgánicas y orgánicas pequeñas (como aminoácidos, azúcares, nucleósidos, vitaminas y *clusters* de metales) a compuestos orgánicos más grandes (péptidos,

⁴ Los transportadores que utilizan energía de la hidrólisis de ATP para bombear moléculas a través de una membrana se denominan ATPasas, y constituyen una gran superfamilia. A esta pertenecen aquellos transportadores que bombean protones (H^+) o iones metálicos (Na^+ , Ca^+) así como la familia ABC que se caracteriza porque sus dominios NBD poseen el motivo ABC-*signature*.

lípidos, oligonucleótidos y polisacáridos). Dada la naturaleza diversa del sustrato que es transportado, los TMD no están conservados significativamente entre los distintos transportadores, aunque si se conserva su topología, ya que todos ellos forman un poro transmembrana a través del cual se mueve el soluto (Locher, 2016). Los dominios NBD son hidrofílicos y se ubican periféricos a la membrana, interaccionando con *loops* de los TMD que protruyen hacia el citosol; contienen aproximadamente 200 aminoácidos, son altamente conservados y poseen actividad de hidrólisis de ATP. En cada NBD se pueden reconocer un conjunto de motivos característicos, que ha recibido el nombre de “casete de unión a ATP” y son los siguientes: un *loop* de unión a fosfato (*loop* P o motivo Walker A) que une los fosfatos α y β del ATP; el *loop* A, con una cadena lateral aromática que interacciona con el anillo de purina del ATP; el motivo Walker B, que contiene el glutamato catalítico; el motivo “ABC-signature” (una región corta de consenso LSGGQ), que fija y orienta al ATP durante la hidrólisis; una histidina de “switch” (o *loop* H), que estabiliza la geometría del estado de transición; el *loop* Q, que contacta con los TMD; y el *loop* D, de dimerización, que contacta los NBD entre sí y acopla la hidrólisis del ATP al transporte del soluto (Locher, 2016; Wilkens, 2015). Este casete es evolutivamente muy antiguo y ha surgido previo a la divergencia evolutiva que separó a procariotas y eucariotas. En consecuencia, estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas y existen muchos ejemplos de proteínas ABC en todos los dominios de la vida, constituyendo la mayor familia de proteínas filogenéticamente relacionadas de todo el mundo vivo (Higgins y Linton, 2003). Por ejemplo, *E. coli* posee 79 genes ABC (5 % de su genoma; Linton y Higgins, 1998), mientras que los humanos tienen 48 genes de esta familia.

El transporte se inicia con la interacción entre el sustrato y su sitio de unión en los TMD, lo cual se transmite a los NBD para que unan ATP y, a su vez, esto induce cambios conformacionales en la proteína que provocan que el sustrato sea translocado y liberado del lado opuesto de la membrana. La subsiguiente hidrólisis del ATP a ADP y Pi (fosfato inorgánico) deja al transportador listo para otro ciclo de transporte. Esto es en líneas generales, dado que los detalles del mecanismo de transporte difieren de transportador en transportador (Zutz y col., 2009; Locher, 2016).

Los transportadores tipo ABC pueden ser clasificados en importadores (y a su vez en tipo I o tipo II) o exportadores, según la dirección en que bombean el sustrato

en condiciones fisiológicas. En bacterias existen ambos tipos, mediando la importación de nutrientes esenciales (Dassa, 2003) y la exportación de toxinas (Chang, 2003); en eucariotas, las evidencias experimentales indican que todos los transportadores de este tipo identificados actuarían como exportadores, con algunas excepciones. Se localizan tanto en membrana plasmática como en las membranas de peroxisoma, RE, Golgi y mitocondria de eucariotas. En humanos, median importantes procesos fisiológicos, por ende, no es sorpresa que mutaciones en estos transportadores sean causa de numerosas enfermedades (Burke y Ardehali, 2007; Dean, 2005).

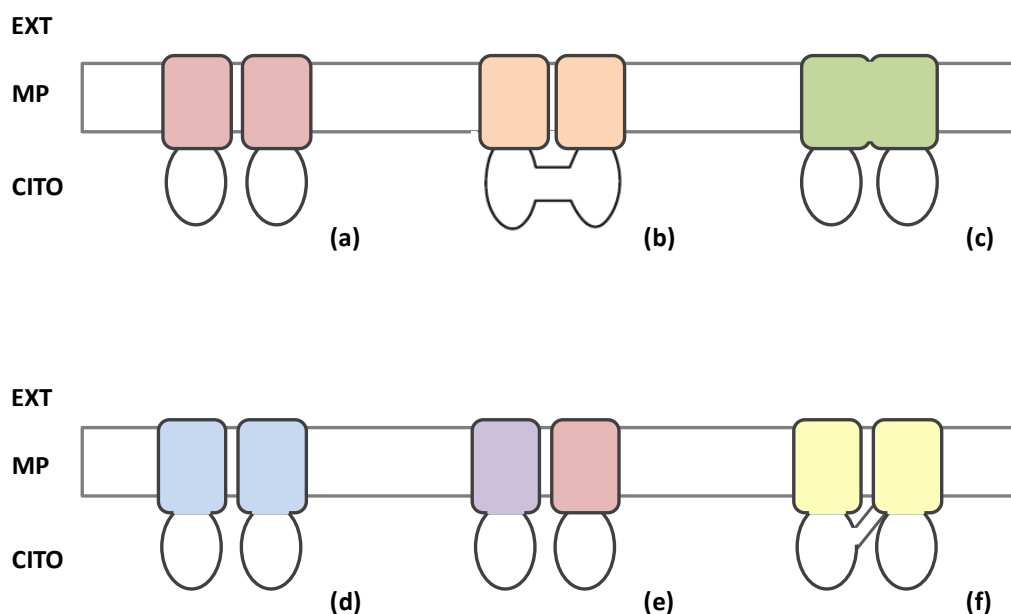


Figura 9. Organización en dominios de los transportadores ABC. Un transportador ABC típico consiste de 2 TMD (cuadrados sombreados) y 2 NBD (ovalos blancos). Estos dominios pueden estar combinados en diversidad de formas: **(a)** siendo unidades individuales; **(b)** estando los NBD fusionados en un único polipéptido; **(c)** estando los TMD formando parte de un único polipéptido; **(d)** estando cada NBD fusionado a un TMD y asociado a otro NBD-TMD idéntico (homodímero); **(e)** estando un NBD-TMD asociado a otro NBD y TMD no idéntico (heterodímero); **(f)** siendo los 4 dominios parte de un único polipéptido. En bacterias se observan cualquiera de las combinaciones alternativas; en eucariotas la mayoría de transportadores ABC están constituidos por un único polipéptido que contiene las 4 unidades funcionales (f), con algunos miembros formados por el ensamblado de 2 “medio transportador” (casos d y e). Algunos transportadores tienen subunidades adicionales (no se muestra) necesarias para el proceso de transporte, generalmente involucradas en la captación del sustrato y su presentación al sitio de unión en el TMD (Wilkins, 2015). En esta figura los representados son todos exportadores (NBD hacia el citosol). EXT, exterior, MP, membrana plasmática, CITO, citoplasma. Adaptado de Higgins y Linton, 2003.

III.4 Herramientas bioquímicas, genéticas y moleculares para estudiar a *Trypanosoma cruzi*

La secuenciación del genoma de *T. cruzi*, junto con la de otro tripanosomátidos, se completó en el año 2005 (El-Sayed y col., 2005). Actualmente, existen 9 genomas de

cepas de *T. cruzi* disponibles en la base de datos TriTryp (tritrypdb.org/tritrypdb). Con tanta información disponible es sumamente importante la disponibilidad de herramientas genéticas para analizar la función de sus genes en el organismo nativo. Sin embargo, de entre todos los tripanosomátidos, *T. cruzi* es el que presenta más limitaciones técnicas. Si bien es posible propagar *in vitro* el parásito en sus distintas formas de vida, todos procesos optimizados en nuestro laboratorio, los estudios de función génica son difíciles de llevar a cabo por numerosas razones. En primer lugar, existen pocas herramientas genéticas para *T. cruzi* comparado con las existentes para otros organismos, tanto procariotas (*E. coli* o *Bacillus subtilis*) como eucariotas (*S. cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, por mencionar algunos). Los primeros intentos por manipular genéticamente los tripanosomátidos fueron realizados recién en la década de 1980, por el desconocimiento que había hasta ese entonces sobre la forma en que éstos dirigen la expresión de sus genes, sumado a que aún no se habían desarrollado los métodos de transfección con ADN. Actualmente se sabe que estos organismos presentan algunas peculiaridades en su biología. En *T. cruzi*, la ARN Polimerasa II no utiliza factores de transcripción típicos, ni se han identificado promotores consenso, y la regulación de la expresión génica ocurre principalmente mediante eventos post-transcripcionales de procesamiento del ARN -inicialmente policistrónico- como el *transplicing* y la poliadenilación, el *editing*, o su estabilidad, entre otros (Clayton y Shapira, 2007). A partir de entender estas características fue posible el diseño inicial de vectores, el cual fue evolucionando hasta el repertorio de plásmidos que hay en la actualidad. En este momento se cuenta con vectores episomales e integrativos; los primeros (por ejemplo, pTEX) poseen secuencias flanqueantes de otros genes como el de la GAPDH glicosomal, que guían la expresión del transgen, mientras que los segundos permiten la integración en el genoma vía recombinación homóloga, por ejemplo, por portar un fragmento de ADN ribosómico (por ejemplo, pRIBOTEX) (Taylor y col., 2011). Además, se encuentran disponibles diferentes marcadores de selección como la resistencia a geneticina (G418R), higromicina B (HygR) y tetraciclina (TetR). La adición de secuencias codificantes de etiquetas ha permitido realizar ensayos de localización de las proteínas expresadas por los genes de interés y la utilización de promotores de expresión regulable ha permitido el estudio de aquellos productos proteicos cuya sobreexpresión tenga efectos deletéreos sobre el parásito. A tal efecto

en nuestro laboratorio se utiliza de rutina un sistema de expresión regulable por tetraciclina (Tet) que consiste de: (1) el vector pTcINDEX (apartado IV.2.1), con un sitio de múltiple clonado (SMC) bajo control de un promotor T7 y de un operador *TetO*, y se integra en una región espaciadora no transcripta de genes ribosomales; (2) otro vector episomal, el vector pLEW13, que expresa de manera constitutiva los genes bacterianos *tetR* (represor transcripcional activo en ausencia de Tet) y el codificante de la T7 ARN Polimerasa. Los marcadores de selección son HygR para pTcINDEX y G418R para pLEW13. Como se observa, este sistema utiliza elementos génicos de otros organismos que permiten crear un sistema de expresión inducible en organismos cuya expresión no operaría de la manera convencional (Taylor y Kelly, 2006).

En segundo lugar, la transfección es el método disponible para la incorporación de genes en *trans* en *T. cruzi*. Sin embargo, la baja eficiencia de este proceso en comparación a una transformación bacteriana, por ejemplo, es otro factor que dificulta el avance de las investigaciones. Además, se requieren aproximadamente unas 8 semanas para la obtención de transfectantes estables de *T. cruzi*, si los hubiere, un tiempo bastante más prolongado en comparación a otros tripanosomátidos (requiere 1 semana para *T. brucei* y 2 semanas para *Leishmania*) (Taylor y col., 2011).

Por último, *T. cruzi* y también algunas especies de *Leishmania*, no presentan la maquinaria molecular necesaria para el silenciamiento de genes por el mecanismo de interferencia de ARN (ARNi), una herramienta ubicua en eucariotas, incluyendo otros tripanosomátidos como *T. brucei* y sumamente útil para el estudio de función génica (Ullu y col., 2004; DaRocha y col., 2004). La ausencia de un sistema de silenciamiento de ARN, hace necesario utilizar otras estrategias, como la generación de *knock outs* y la sobreexpresión en *trans* de versiones mutantes del gen de interés que produzcan un efecto dominante negativo frente a la versión silvestre, aunque posiblemente esto resulte letal para el organismo bajo estudio en caso de genes esenciales. En particular, la obtención de *knock outs* por el método convencional es mucho menos eficiente en *T. cruzi* comparado a otros organismos y se le suma el hecho que muchos genes están codificados por familias génicas multi-copia, por lo que esta técnica es laboriosa y consume tiempo, cuando no fracasa (Clayton, 1999). Superados los obstáculos experimentales anteriores, resulta sumamente complejo obtener una población clonal

luego de la selección de transfectantes estables, sumando una complicación más al estudio de este parásito (Nunes y col., 1990).

Por lo expuesto anteriormente, existe la necesidad de contar con organismos modelo, que permitan superar las dificultades experimentales mencionadas a la vez que, teniendo cercanía evolutiva con *T. cruzi*, presenten las rutas metabólicas que se intentan elucidar. Esta estrategia permitirá obtener información complementaria sobre el proceso en estudio en el parásito. Contando en el laboratorio con la experiencia y las herramientas para realizar estudios en *S. cerevisiae*, nos planteamos la posibilidad de utilizar a esta levadura como modelo para el estudio de proteínas originarias de *T. cruzi* posiblemente involucradas en los procesos de transporte y metabolismo de hemo que ocurren en este organismo.

III.5 *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae es popularmente conocida como la levadura de la cerveza (del griego *Saccharo* que significa azúcar, *myces* que significa hongo y *cerevisiae*, cerveza). Este microorganismo es un eucariota unicelular de forma redondeada, perteneciente a la familia *Saccharomycetaceae*, clase *Hemiascomycetes*, y como modelo biológico ha contribuido de manera muy importante a elucidar los procesos básicos de la fisiología celular (Botstein y col., 1997; Karathia y col., 2011). A diferencia de *T. cruzi* posee características estructurales más simples y carece de flagelo (Figura 10a). Además, presenta una tasa de crecimiento rápido, es fácil de mantener en cultivo y se pueden obtener colonias aisladas (clones). Es un microorganismo no patógeno, y existe una vasta diversidad de herramientas genéticas y moleculares, que permiten su manipulación con mínimas precauciones, incluyendo un sistema de transformación de ADN sencillo y versátil. En su ciclo de vida *S. cerevisiae* presenta dos fases biológicas estables: haploide y diploide. Éstas permiten generar, aislar y caracterizar mutantes con mucha facilidad (los caracteres presentes en el genoma nuclear segregan de manera Mendeliana), así como realizar estudios de complementación de función génica (Figura 10b). Se conoce la secuencia completa de su genoma (<https://www.yeastgenome.org/>), que consiste de 16 cromosomas por célula haploide, apenas unas cuantas veces mayor que el de *E. coli* y 200 veces menor que el de células de mamífero. Muchos de sus genes codifican para proteínas con funciones similares a

las presentes en otros eucariotas más complejos, algunas obvias como las de ribosomas y citoesqueleto, otras sorprendentes como proteínas codificadas por protooncogenes (Kataoka y col., 1985; Mewes y col., 1997). Por estas y otras razones ha sido y es ampliamente utilizado como modelo de estudio biológico de otros eucariotas sencillos así como de eucariotas superiores, incluso hasta del hombre. Su metabolismo es aeróbico facultativo, es decir, tienen la capacidad de respirar en presencia de O_2 –proceso que requiere hemo- mientras que en ausencia de oxígeno hacen fermentación, proceso que también realizan en presencia de oxígeno cuando la fuente de carbono es abundante. Esta propiedad se ha explotado desde hace muchos años en la producción de pan y de bebidas alcohólicas.

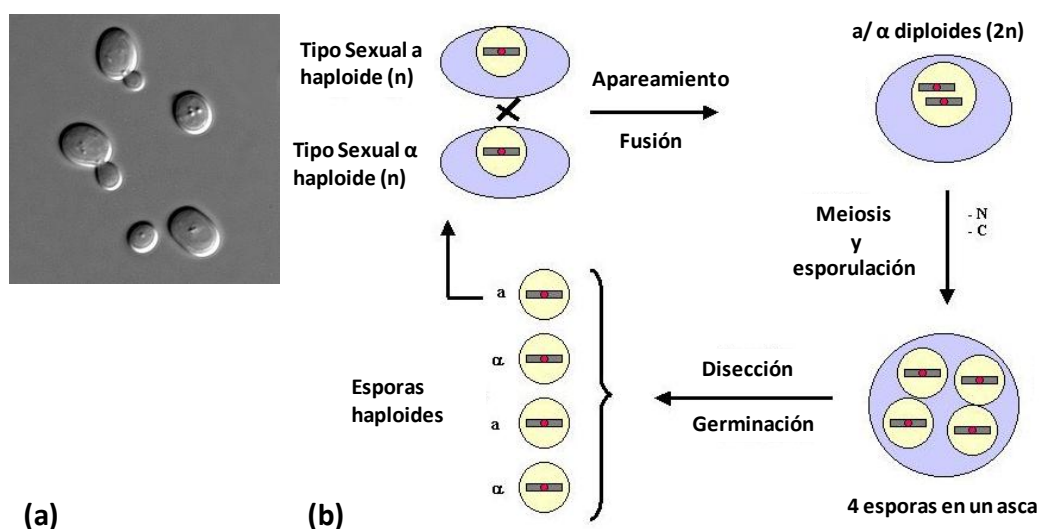
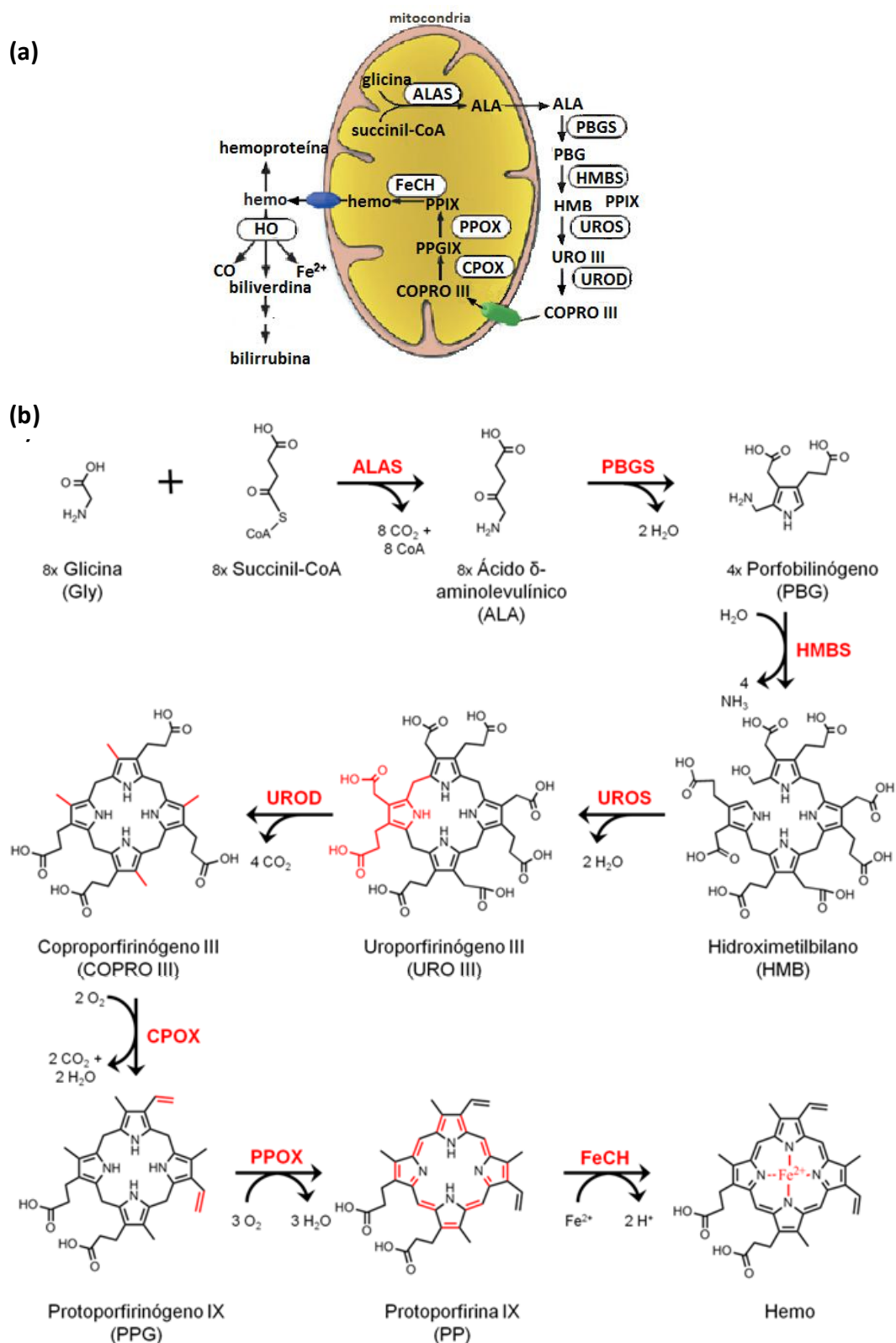


Figura 10. (a) Células de *Saccharomyces cerevisiae* vistas al microscopio DIC. (b) Esquema del ciclo de vida de *Saccharomyces cerevisiae*. Durante la fase vegetativa, la levadura se divide asexualmente por gemación tanto en cultivos de células diploides como haploides. En el estado haploide es posible aislar mutantes recesivos. Cuando se aparean células haploides de diferente tipo sexual, se obtienen células diploides, útiles para el estudio de complementación de fenotipos. Estas pueden en determinadas condiciones dividirse meióticamente, en cuyo caso se obtiene un asca que contiene cuatro ascoesporas haploides. El gen que determina el tipo sexual (*MATa* o *MATα*) segrega 2:2, es decir se producen dos esporas a y dos esporas α. Recientemente se encontró que además son capaces de formar pseudohifas (no se muestra).

III.5.1 Biosíntesis de hemo en *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae es capaz de sintetizar hemo en condiciones aeróbicas y, a su vez, este cofactor regula la expresión de otros genes necesarios para la respiración (Mense y Zhang, 2006). La biosíntesis de hemo en *S. cerevisiae* consiste de 8 reacciones enzimáticas, comenzando y terminando en la matriz mitocondrial con varias etapas intermedias en el citosol (Figura 11a). Al igual que las α-proteobacterias y demás

eucariotas no fotosintéticos, *S. cerevisiae* sintetiza δ -ALA a través de la condensación de glicina y succinil-CoA por la acción de la ácido δ -aminolevulínico sintasa (ALAS) (Figuras 11a y 11b).



(continuación)

(c)

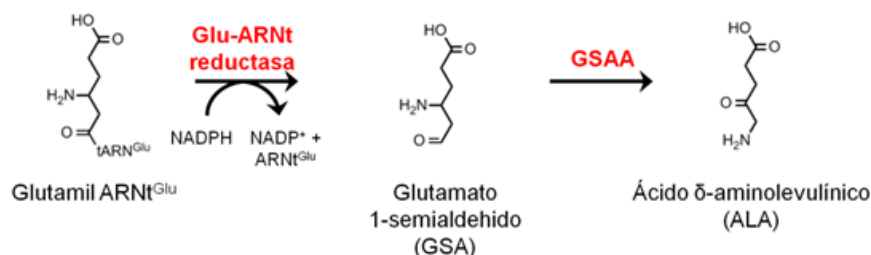


Figura 11. Biosíntesis de hemo en *Saccharomyces cerevisiae*. (a) En la mayoría de eucariotas no fotosintéticos incluyendo *S. cerevisiae*, la vía de síntesis de hemo comienza y termina en la matriz mitocondrial con algunos pasos intermedios en el citosol. (b) En α -proteobacterias y eucariotas no fotosintéticos, el δ -ALA se obtiene por condensación de glicina y succinil-CoA. (c) En la mayoría de los organismos procariotas y en organismos eucariotas fotosintéticos, el δ -ALA se sintetiza a partir de glutamil ARNt^{Glu} y a través de 2 reacciones secuenciales. Enzimas de la vía: ALAS (ácido δ -aminolevulínico sintasa); PBGS (porfobilinógeno sintasa); HMBS (hidroximetilbilano sintasa); UROS (uroporfirinógeno III sintasa); UROD (uroporfirinógeno III decarboxilasa); CPOX (coproporfirinógeno III oxidasa); PPOX (protoporfirinógeno IX oxidasa); FeCH (ferroquelatasa); Glu-ARNt reductasa (glutamil ARNt^{Glu} reductasa) y GSAA (glutamato 1-semialdehído aminotransferasa). Adaptado de Furuyama y col., 2007; Hamza y Dailey, 2012; Warren y Smith, 2009.

III.5.2 Funciones del hemo B en *Saccharomyces cerevisiae*

Numerosas hemoproteínas se encuentran presentes en la mitocondria, que es la organela donde cursan las 3 reacciones finales de la síntesis de hemo. En este caso, el cofactor se hallaría accesible para ensamblarse con la apoproteína correspondiente, por ejemplo, los componentes de la cadena respiratoria mitocondrial. En esta localización también están presentes las enzimas ScCox10 y ScCox15 (HOS y HAS, respectivamente, de *S. cerevisiae*) embebidas en la membrana mitocondrial interna, que modifican químicamente el hemo B sintetizado para producir hemo A. Las evidencias experimentales presentadas sugieren que estas enzimas se encuentran reguladas tanto a nivel de su síntesis como de su actividad. El gen *ScCOX15*, a diferencia del gen *ScCOX10*, responde transcripcionalmente a la concentración de hemo intracelular. Ambos genes son además regulados por la disponibilidad de distintas fuentes de carbono y por los niveles de oxígeno. La cantidad de cada proteína en el interior de una célula es también diferente en *S. cerevisiae*: la relación entre la concentración de ScCox15 respecto de ScCox10 es de 8:1 (Wang y col., 2009). Por esto y otras observaciones se ha propuesto que alguna de las dos proteínas presentaría alguna función adicional a la de su actividad HOS o HAS -según corresponda- y que ScCox10 sería el paso limitante de la vía de biosíntesis de hemo A. Sin embargo, la

regulación principal de esta ruta no es a través de la síntesis de estas enzimas, sino de su actividad: se ha observado que mutar el factor de traducción Mss51, lo cual bloquea completamente la traducción de la subunidad 1 de la CcO (Cox1) no afecta los niveles de proteína de ScCox10 o ScCox15, pero si limita la producción de hemo A (Wang y col., 2009). Por otro lado, la mutación de residuos esenciales de ScCox15, que anula su actividad, no genera la acumulación de hemo O en exceso, aún en condiciones donde conjuntamente se sobreexpresa el gen *ScCOX10*. Estos resultados permitieron proponer que los productos de la enzima ScCox15 (hemo A) o los intermediarios de la síntesis de CcO regulan la reacción catalizada por ScCox10, es decir la farnesilación del hemo B (Barros y col., 2001; Barros y Tzagoloff, 2002). Por último, se ha observado que la oligomerización de cada una de las enzimas es necesaria para que puedan desarrollar su actividad HOS y HAS (Bestwick y col., 2010; Khalimonchuk y col., 2010; Khalimonchuk y col., 2012).

III.5.3 Transporte de hemo en *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae no posee transportadores de hemo de alta afinidad en membrana plasmática, depende principalmente del hemo sintetizado por ella más que del exógeno (revisado en Hamza y Dailey, 2012). Sin embargo, se han identificado transportadores de tipo ABC vinculados a la homeostasis de hemo en otras localizaciones. De éstos, nos centraremos en aquellos de localización mitocondrial, dado que son los de nuestro interés.

El primer transportador de tipo ABC mitocondrial identificado fue descubierto en *S. cerevisiae*, se lo denominó Atm1 (Leighton y Schatz, 1995) y se observó que era necesario para el normal crecimiento de la levadura. Estudios adicionales mostraron que defectos en este transportador causaban la acumulación de hierro en mitocondria sin un cambio notable en la biosíntesis de hemo o su transporte, por lo que se considera que tiene un rol en la exportación de precursores de centros Fe-S sintetizados en la mitocondria para su incorporación a proteínas citosólicas (Kispal y col., 1999). Un estudio más avanzado sobre la respuesta transcripcional ante la ausencia de Atm1, así como de otros componentes del sistema de ensamblado de centros Fe-S, mostró un fuerte aumento de la expresión de aproximadamente unos 200 genes (Hausmann y col., 2008). El efecto global incluye la activación de sistemas

de alta afinidad para captar hierro del exterior, la represión de la respiración y el metabolismo de hemo, y la inducción de los genes involucrados en la adquisición de glucosa, de manera de compensar la deficiencia respiratoria.

Posteriormente se observó que esta levadura posee otros 2 transportadores de tipo ABC mitocondriales, denominados Mdl1 y Mdl2. Ambos son exportadores aunque ninguno de ellos es específico para hemo (Jungwirth y Kuchler, 2006). Mdl1 se identificó en 1994, es homóloga a la proteína ABCB10 de humano, y se observó que su deficiencia no ocasiona un fenotipo distintivo en el crecimiento de células de levadura, sí una disminución en la translocación desde la mitocondria al citosol de péptidos de un tamaño comprendido en 0,6 a 21 kDa (Dean y col., 1994). En intentos por determinar la especificidad de sustrato de Mdl1, se utilizó una biblioteca de sustratos potenciales constituida por péptidos muy diversos estructuralmente. Se ensayó la actividad de unión de sustrato y transporte de Mdl1 reconstituida en proteoliposomas y microsomas y ninguno de los péptidos utilizados fue reconocido por el transportador, lo que indica que tendría preferencia por un grupo muy reducido de péptidos, que no se encuentran representados en las bibliotecas de péptidos disponibles. En base a esto, se presume que Mdl1 exportaría péptidos derivados de proteínas de membrana interna mitocondrial que han sido proteolizadas ante estrés oxidativo, por un tipo de sistema de control de calidad mitocondrial, junto con otros factores adicionales, como iones metálicos o compuestos sulfurados (centros Fe-S, por ejemplo) (Zutz y col., 2009; Young y col., 2001). La relevancia fisiológica de este proceso está en debate dado que existen otros sistemas proteolíticos que median la extrusión de péptidos fuera de la matriz mitocondrial, así como enzimas que digieren estos péptidos a aminoácidos antes de ser exportados. Además, péptidos generados por otras proteasas pueden abandonar la mitocondria aún en ausencia de Mdl1. Por último, en la búsqueda de genes que puedan suprimir el fenotipo de células *atm1Δ* se identificó *MDL1* como capaz de complementar la delección de *ATM1*. Se observó que una sobreexpresión de *MDL1* en células de levadura *atm1Δ* presentan una recuperación parcial del fenotipo salvaje (Chloupková y col., 2003).

La función fisiológica de la proteína Mdl2, un homólogo cercano de Mdl1, no ha sido caracterizada hasta la fecha. Células deficientes en esta proteína presentan un crecimiento ligeramente disminuido en fuentes de carbono como glicerol-etanol, en

comparación a las células salvajes (Young y col., 2001). Otros estudios mostraron que las células *mdl2Δ* también crecen débilmente en ácido oleico, lo cual sugiere una función para Mdl2 relacionada a la homeostasis de lípidos en mitocondria (Lockshon y col., 2007).

Hasta la fecha no se ha identificado el transportador responsable de exportar al citosol el hemo sintetizado en la mitocondria de *S. cerevisiae*, para que éste sea incorporado en las apohemoproteínas citosólicas correspondientes, o de otras localizaciones. Dada la importancia que posee este cofactor, *S. cerevisiae* podría presentar un mecanismo de transporte promiscuo, de manera de asegurar la distribución intracelular del hemo sintetizado por ella.

III.6 Objetivos

T. cruzi debe adquirir el hemo B desde el entorno - sus distintos hospedadores, insecto o mamífero- para suplir la deficiencia en la síntesis del cofactor. Éste, una vez incorporado al interior celular, deberá ser dirigido hacia los distintos blancos. En particular, en la mitocondria será incorporado en distintas hemoproteínas -incluidos los complejos II y III de la cadena respiratoria- o será convertido a hemo A por TcCox10 y TcCox15, para ser incorporado a la CcO (Buchensky y col., 2010).

Ante todo lo expuesto, resulta vital la comprensión detallada de las vías de transporte y distribución de este cofactor en el parásito, cuyo bloqueo podría causar severos efectos en su ciclo de vida. En este contexto, surgen las siguientes preguntas: ¿Cómo llega el hemo hasta la mitocondria para su posterior inserción a las hemoproteínas correspondientes? y, ¿Cómo ocurre la biosíntesis de hemo A?

T. cruzi presenta ciertas dificultades para su manipulación experimental en el laboratorio, a diferencia de la facilidad que en su lugar presenta *S. cerevisiae*, un modelo eucariota sencillo no patógeno, ampliamente utilizado tanto en nuestro laboratorio como en otros grupos de investigación del metabolismo de hemo. En estas condiciones y dada la experiencia y las herramientas disponibles parece factible utilizar a *S. cerevisiae* como herramienta para el estudio de ciertos genes y/o procesos que ocurren en *T. cruzi*. Si bien en *S. cerevisiae* no se han identificado hasta la fecha transportadores de hemo mitocondriales, no se descarta como se detallará a

continuación (Capítulo 1 de Resultados) su utilización para el estudio de funciones ortólogas.

Es por ello que en el presente trabajo de Tesis profundicé los estudios con respecto a TcCox10 y a un posible transportador de hemo mitocondrial de *T. cruzi* del tipo ABC, mtTcAbcB, utilizando a *S. cerevisiae* como organismo base para el estudio de los genes codificantes de estas proteínas de *T. cruzi*, con el fin de elucidar propiedades y características del transporte y metabolismo de hemo en el parásito.

III.6.1 Objetivos generales

El objetivo general propuesto para este proyecto es el estudio de función de proteínas de *T. cruzi* con posible rol en el metabolismo y en el transporte de hemo hacia el interior de la mitocondria del parásito para luego ser utilizado como cofactor de los complejos respiratorios. Se propone a *S. cerevisiae* como sistema modelo de este estudio. Para ello, se formulan los objetivos específicos que se detallan a continuación.

III.6.2 Objetivos específicos

1) identificar la función de la proteína codificada por el gen *mtTcABCB* de *T. cruzi*, denominado así por su homología con la proteína de mamíferos ABCB6 involucrada en el transporte mitocondrial de porfirinas.

2) profundizar el estudio del rol funcional de TcCox10, una de las enzimas involucradas en la biosíntesis de hemo A.

IV- Materiales y Métodos

IV.1 Herramientas bioinformáticas

IV.1.1 Bases de Datos

Las secuencias genómicas utilizadas en este trabajo se obtuvieron de las bases de datos de tripanosomátidos TritrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) (Aslett y col., 2010), de *Saccharomyces genome database* (<http://www.yeastgenome.org/>) y de la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), donde se realizaron las búsquedas por similitud mediante BLAST (BLASTp o BLASTn).

IV.1.2 Análisis de secuencias

El diseño de las estrategias de clonado se llevó a cabo utilizando el software Clone Manager Suite 7 versión 7.11 (Sci Ed Central). Los alineamientos múltiples de secuencia fueron realizados con el programa Clustal X versión 2.0 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) (Larkin y col., 2007). Los porcentajes de identidad y similitud se calcularon a partir de estos alineamientos obtenidos en el programa *Ident and Sim* (http://www.bioinformatics.org/sms2/ident_sim.html). Los dominios conservados se identificaron con el programa CDART del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/lexington/lexington.cgi>) (Geer y col., 2002).

Las secuencias proteicas se analizaron con el programa CCTOP (*Constrained Consensus TOPology prediction server*, <http://cctop.enzim.ttk.mta.hu>) (Dobson y col., 2015) que incluye análisis de los siguientes algoritmos: TMHMM Server 2.0, Phobius, y HMMTOP; adicionalmente se utilizó el programa TMPred (http://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html) (Hofmann y col., 1993) para determinar las probables regiones transmembrana de estas secuencias. Los péptidos señal y la probabilidad de localización mitocondrial fueron predichos con los programas MITOPROT (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>) (Claros y Vincens, 1996), TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) (Emanuelsson y col., 2000), SignalP (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/), Predotar (Small y col., 2004) e IPSORT (<http://ipsort.hgc.jp/>; Bannai y col., 2002).

La masa molecular de las proteínas se calculó a partir de sus secuencias primarias con el programa Compute pI/MW (http://web.expasy.org/compute_pi/).

Además se utilizó el programa PyMOL Viewer (www.pymol.org) para la predicción de estructura en tres dimensiones (De Lano, 2002).

IV.2 Plásmidos y oligonucleótidos utilizados

IV.2.1 Plásmidos

Los plásmidos utilizados en el presente trabajo se detallan en la Tabla I y algunos se representan en la Figura 12.

Tabla I. Plásmidos.

| Nombre | Características relevantes |
|---|---|
| pTcGFPN (Batista y col., 2010) | Contiene la secuencia sintética que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP, <i>Green Fluorescent Protein</i>). Confiere el fenotipo G418R para la selección en <i>T. cruzi</i> . Confiere resistencia a cloranfenicol (CImR) y a ampicilina (AmpR) en <i>E. coli</i> . |
| pENTR3C de la serie Gateway® pENTR™ Vectors (Invitrogen) | Plásmido comercial que contiene sitios <i>attL1</i> y <i>attL2</i> para la recombinación sitio específica con un vector de destino Gateway. Contiene el gen <i>ccdB</i> localizado entre los sitios <i>attL</i> para la selección negativa y el gen de resistencia a kanamicina (KanR) para la selección positiva en <i>E. coli</i> . Tiene un origen de replicación pUC de alto número de copias y un sitio de múltiple clonado (SMC). |
| pENTR3C. <i>TcCOX10.HIS</i> | Derivado de pENTR3C, contiene el gen <i>TcCOX10</i> de <i>T. cruzi</i> (secuencia salvaje) como fusión a una secuencia que codifica para una cola C-terminal de 6 histidinas (<i>HIS</i>) y clonado entre los sitios <i>BamH I</i> y <i>Xho I</i> (construido previamente en el laboratorio). |
| pGEM-T Easy. <i>mtTcABCB.HIS</i> | Derivado del plásmido comercial de clonado pGEM-T Easy (Promega), contiene el gen <i>mtTcABCB</i> clonado fusionado en 3' a una secuencia que codifica para una cola de 6 His, entre sitios <i>Hind III</i> y <i>Xho I</i> (construido previamente en el laboratorio). |
| pRS426M25 (Buchensky y col., 2010) | Plásmido derivado del vector de expresión en levaduras pRS426 (Mumberg y col., 1994); puede replicarse tanto en <i>S. cerevisiae</i> (marcador de selección <i>URA3</i>), como en <i>E. coli</i> (selección por AmpR). Además, posee un casete de expresión constituido por el promotor regulable del gen <i>MET25</i> , un SMC y la secuencia terminadora del gen <i>CYC1</i> (citocromo c1). |
| pRS426M25. <i>ScCOX10.HIS</i> | Derivado de pRS426M25, contiene el gen <i>ScCOX10</i> de <i>S.</i> |

| | |
|---|--|
| (Buchensky y col., 2010) | <i>cerevisiae</i> como fusión en 3' a una secuencia para 6 His, clonado entre <i>BamH</i> I y <i>Hind</i> III. AmpR. |
| pRS426M25. <i>TcCOX10.HIS</i> (Buchensky y col., 2010) | Derivado de pRS426M25, contiene el gen <i>TcCOX10</i> de <i>T. cruzi</i> como fusión a una secuencia que codifica para una cola C-terminal de 6 histidinas, clonado entre los sitios <i>BamH</i> I y <i>Xho</i> I. AmpR. |
| pRS426M25. <i>mtTcABCB.HIS</i> | Contiene el gen <i>mtTcABCB</i> de <i>T. cruzi</i> como fusión a una secuencia que codifica para una cola C-terminal de 6 histidinas, clonado entre los sitios <i>BamH</i> I y <i>Xho</i> I. AmpR. |
| pRS414 (Mumberg y col., 1994) | Vector de expresión en levaduras; puede replicarse tanto en <i>S. cerevisiae</i> (marcador de selección <i>TRP1</i>), como en <i>E. coli</i> (selección por AmpR). Gentileza del laboratorio de Dennis Winge, de la Universidad de Utah, Utah, USA. |
| pLEW13 (Taylor y Kelly, 2006) | Posee el gen <i>ARN polimerasa T7</i> , el gen <i>tetR</i> que reprime la expresión del promotor del vector pTcINDEX en ausencia de Tet y el gen <i>neo</i> para la selección por G418R, todos de expresión constitutiva. Puede replicarse en <i>E. coli</i> y en <i>T. cruzi</i> . |
| pTcINDEX (Taylor y Kelly, 2006) | Vector integrativo en las zonas espaciadoras entre los genes de ARN ribosomales del genoma de <i>T. cruzi</i> , regiones transcripcionalmente silentes. Posee el gen de la higromicina B fosfotransferasa (<i>hyg</i>) bajo control del promotor T7. Cuando se usa en conjunto con pLEW13, el agregado de higromicina B (Hyg) selecciona indirectamente este plásmido (sin necesidad de agregado de geneticina - G418) debido a que la ARN polimerasa T7 es necesaria para transcribir la resistencia a esta droga desde pTcINDEX. La secuencia clonada en el SMC queda bajo el control del promotor T7 y de un operador <i>TetO</i> que la hace reprimible en ausencia de Tet. Flanqueando el SMC posee secuencias intergénicas de actina de <i>T. cruzi</i> para proveer sitios de poliadenilación, sitio aceptor del <i>transsplicing</i> de la proteína ribosomal P2β y un terminador de la ARN polimerasa de T7. Para la manipulación en <i>E. coli</i> posee AmpR. |

pTcINDEX.TcCOX10.HIS Derivado de pTcINDEX, contiene el gen *TcCOX10* de *T. cruzi* como fusión a una secuencia que codifica para una cola C-terminal de 6 histidinas, clonado entre los sitios *Bam*H I y *Nru* I. HygR.

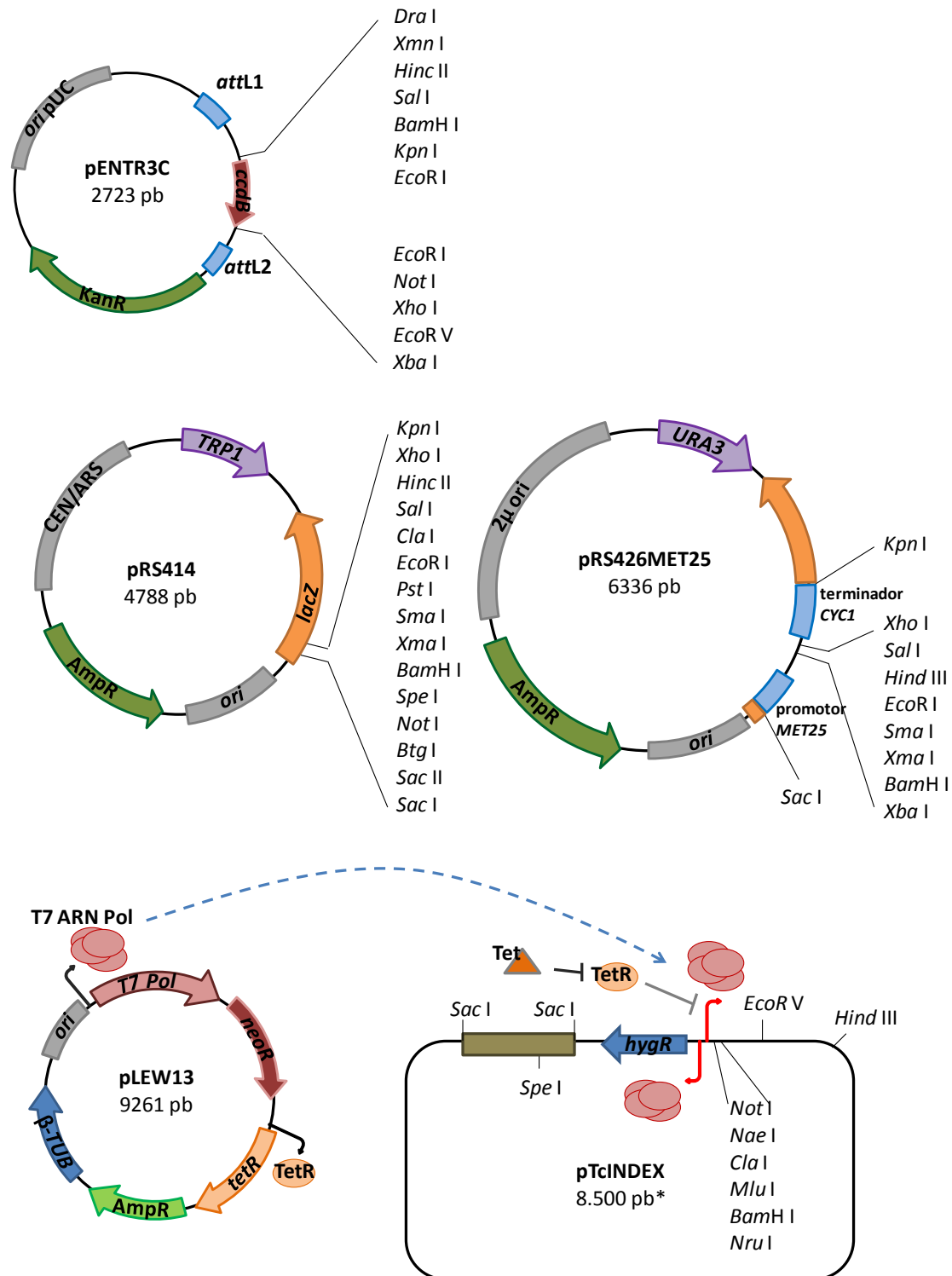


Figura 12. Características de plásmidos comerciales utilizados en el presente trabajo de Tesis. Se muestran los orígenes de replicación, sitios de corte de algunas enzimas de restricción, genes de resistencia y auxotrofia, y otros casetes de interés. *Dado que la secuencia completa de pTcINDEX no se conoce por completo, su tamaño es estimado.

IV.2.2 Oligonucleótidos

En la Tabla II se detallan los oligonucleótidos utilizados en este trabajo de Tesis:

Tabla II. Secuencias de oligonucleótidos. Se muestran subrayados los sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción.

| Inserto amplificado | Oligonucleótidos | Secuencias 5'-3' |
|---|------------------|--|
| (<i>Bam</i> H I) <i>TcCOX10</i> | FP.TcCox10B | 5'-GCGGATCCATGATCCGACGAGCCCTTC-3' |
| <i>TcCOX10.HISnon-stop</i> (<i>Xho</i> I) | RevHis-noStop | 5'-CGCCTCGAGATGATGATGATGATGATGACC-3' |
| (<i>Bam</i> H I) <i>mtTcABCB</i> | FPTcABCB-2 | 5'-CCGATGGATCCATGCGGCGCGTTGCATC-3' |
| <i>mtTcABCB.HISnon-stop</i> (<i>Xho</i> I) | RevHis-noStop2 | 5'-CGCCTCGAGACCATGGTGATGGTGATGATG-3' |
| (<i>Xho</i> I) <i>GFP</i> | FPpTcGFPN-3 | 5'-TACCTCGAGATGAGCAAGGGCGAGGAGCTG-3' |
| <i>GFP (stop- Sal</i> I <i>Eco</i> R V - <i>Xba</i> I) | RPpTcGFPN-5 | 5'-CCTCTAGATATCGTCGACTCACGACTTGTACAG CTCGTCC-3' |
| Fragmento interno de <i>mtTcABCB</i> | FSeqTcABCB6-1 | 5'-GTTTAAGATGGTCGTTGAC-3' |
| Fragmento interno de <i>TcCOX10</i> | F2TcCox10 | 5'-AACGGGACCAGCAAG-3' |

IV.3 Cepas y líneas celulares utilizadas

IV.3.1 Cepas bacterianas

Para el clonado de los genes en estudio y para el mantenimiento de los plásmidos utilizados se empleó la cepa de *Escherichia coli* DH5 α : *F endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG ϕ 80 lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 hsdR17(rK mK⁺) λ ⁻*.

IV.3.2 Cepas de levaduras

Para los estudios de funcionalidad de las proteínas de interés se utilizaron las siguientes cepas de *S. cerevisiae*:

- **DY5113 (W303)**: *MATa ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1 Δ ura3-1* (donada por Dennis R. Winge, Universidad de Utah, Utah, EE.UU.).
- **cox10 Δ** , derivada de DY5113 (W303): *MATa ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1 Δ ura3-1 cox10::KanMX4* (Buchensky y col., 2010).

- **BY4743 (diploide), derivada de S288C:** *MATa/α, his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 lys2Δ0/LYS2 MET15/met15Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0*.
- ***mdl2Δ***, derivada de BY4743 (S288C): *MATa/α, his3-Δ1, leu2-Δ, LYS2/lys2Δ0 met15Δ0/MET15, ura3-Δ0, mdl2Δ::KanMX4* (donada por Paul Cobine, Auburn University, 2001).
- ***atm1Δ***, derivada de YHP500 (YNN216): *MATα ura3-52 lys2-801_amber, ade2-101_ochre, trp1-Δ63, his3-Δ200, leu2-Δ1, atm1::LEU2*. (Kispal y col., 1997) del laboratorio del Dr. Roland Lill (Alemania, 2007).
- ***hem1Δ***, derivada de DY1457 (W303): *MATα ura3-52, trp1-1, his3-11, ade6, can1-100(oc) hem1::LEU2* (Crisp y col., 2003).
- ***hem1Δ***, derivada de W303: *MATα ura3-52, trp1-1, his3-11, ade6, can1-100(oc) hem1::HIS3*.

IV.3.3 Líneas celulares

Para el estudio de la biosíntesis de hemo A se utilizó la cepa Dm28c de *Trypanosoma cruzi* (Tcl, aislado en Carabobo – Venezuela, de *Didelphis marsupialis*). En los experimentos de transfección se utilizó la misma cepa portando el plásmido pLEW13 como se detalla en la sección siguiente.

IV.4 Técnicas de cultivo

IV.4.1 Medios de cultivo para *Escherichia coli*

Para el cultivo de *E. coli* se utilizó el medio rico Luria-Bertani (LB) que contiene: extracto de levadura 0,5 % p/v, peptona 1 % p/v, NaCl 1 % p/v (Difco). En su forma sólida, este medio incluye agar-agar 1,5 % p/v. Se emplearon los siguientes antibióticos: kanamicina (Kan) 50 µg/ml, cloranfenicol (CIm) 30 µg/ml y ampicilina (Amp) 150 µg/ml, según el plásmido a seleccionar.

A menos que se indique lo contrario, los cultivos fueron incubados a 37 °C.

IV.4.2 Medios de cultivo para levadura

Para el cultivo de *S. cerevisiae* se utilizó el medio de cultivo rico (YPD, por *Yeast Extract Peptone Dextrose*) que contiene: extracto de levadura 1 % p/v, peptona de carne 2 % p/v y como fuente de carbono glucosa 2 % p/v. Alternativamente, la fuente

de carbono fue galactosa 2 % p/v (YPGal) o glicerol 3 % v/v con etanol 2 % v/v (YPGli-EtOH).

Para el cultivo de *S. cerevisiae* transformadas se utilizó el medio de cultivo sintético selectivo (SCDO, por Sintético Completo *Drop Out*) que contiene: YNB (*Yeast Nitrogen Base*) 1,7 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g/l y *Drop Out mix* 1,1 g/l (*Drop Out mix*: 2,5 g adenina; 1,2 g arginina; 6 g aspártico; 6 g glutámico, 1,8 g lisina; 3 g fenilalanina; 22,5 g serina; 12 g treonina, 1,8 g tirosina y 9 g valina). Dependiendo de las características de la cepa a seleccionar, se agregó: triptófano (Trp) 20 mg/l; histidina (His) 20 mg/l; leucina (Leu) 100 mg/l; metionina (Met) 20 mg/l y/o uracilo (Ura) 20 mg/l. Como fuente de carbono se utilizó: glucosa 2 % p/v (Glu), galactosa 2 % p/v (Gal) o glicerol 3 % v/v con etanol 2 % v/v (Gli-EtOH). Alternativamente se utilizó el medio Sintético Depletado (SD) que a diferencia del SCDO no posee el mix de aminoácidos (*Drop Out mix*) (Tabla IV, sección V.1.2.2.5).

Estos medios en su versión sólida contienen agar-agar 1,5 % p/v y en todos los casos los cultivos fueron mantenidos a 30 °C.

En ensayos de complementación de función se utilizaron concentraciones menores de Met para inducir la expresión de los genes clonados bajo el control del promotor *MET25* del vector pRS426M25 o del pRS414M25⁵.

Para el cultivo de células *hem1Δ*, se suplementó adicionalmente el medio con δ -ALA 250 μM (33 $\mu\text{g/ml}$) o hemina 1 μM (0,65 $\mu\text{g/ml}$). En ensayos de transporte de porfirinas estos compuestos se adicionaron al medio de cultivo en cantidad menor o mayor a la estándar. Alternativamente se utilizó el análogo de hemo PP IX, gentilmente cedida por el Dr. Eric Hegg (Universidad de Utah, Utah, EE.UU.). La solución *stock* de hemina (sal de cloruro de hierro(III) protopofirina IX, forma comercial) se preparó a partir de droga sólida (Frontier Scientific) disolviendo la misma en una solución de NaOH 0,01 N en etanol 50 % v/v a una concentración final de 1 mM. Se esterilizó por filtración en filtros de membrana con tamaño de poro de 0,22 μm , se fraccionó y almacenó a -80 °C hasta su utilización. La solución *stock* de δ -Ala se preparó disolviendo la droga sólida en H_2O destilada (H_2O_d) estéril a una concentración final de 4 mg/ml que posteriormente fue filtrada y almacenada a 4 °C hasta su uso. La solución *stock* de protoporfirina IX (PP IX), se preparó a una concentración de 8,99 mM en

⁵ Construido durante el presente trabajo de Tesis.

DMSO y se conservó a -80 °C hasta su uso. Para su utilización en los ensayos, previamente se diluyó en NaOH 0,01 N alcanzando una concentración final de 1 mM.

IV.4.2.1 Determinación de Densidad Óptica

Para la determinación de la densidad óptica (DO) de un cultivo bacteriano o de levaduras como medida de su concentración, se realizó una dilución 1/10 del cultivo en LB o H₂O_d según corresponda, en un volumen final de 1 ml. La mezcla se transfirió a cubeta de acrílico y se midió DO a 600 nm (DO⁶⁰⁰) en un espectrofotómetro GeneQuant 1300 (GE Healthcare).

IV.4.3 Cultivo de *Trypanosoma cruzi*

Los epimastigotes de *T. cruzi* (Dm28c) fueron mantenidos en fase exponencial de crecimiento (5 a 40 x 10⁶ parásitos/ml) por pasajes sucesivos cada 3 - 5 días en medio indefinido *Liver Infusion Tryptose* (LIT – NaCl 0,4 % p/v, KCl 0,04 % p/v, NaH₂PO₄ 0,8 % p/v, triptosa 0,5 % p/v, infusión de hígado 0,5 % p/v y glucosa 0,8 % p/v) suplementado con 10 % v/v de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor (LIT SFB 10 %) y hemina 20 µM (Camargo, 1964) a 28 °C. Para los mantenimientos de rutina se utilizaron 2 a 5 ml de medio en botellas de cultivo de 25 cm² de superficie mantenidas en posición vertical.

Para el mantenimiento de epimastigotes transfectantes, se suplementó el medio con Hyg 200 µg/ml o de G418 250 µg/ml según corresponda.

IV.4.3.1 Recuento de parásitos

Para el recuento de parásitos, se tomaron 20 µl de cada cultivo de epimastigotes y se adicionaron a 180 µl de formaldehído 3,7 % p/v en PBS (solución tampón fosfato salino, que contiene NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 4,7 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM y KCl 2,7 mM). Se colocaron 10 µl de la mezcla en cámaras de Neubauer (Boeco) y se contó el número de parásitos. Se calculó la cantidad de parásitos por ml de cultivo considerando la dilución realizada y la cantidad de cuadrantes contados (de 10⁻⁴ ml de volumen cada uno) de la cámara utilizada.

Alternativamente se utilizó un contador hematológico automatizado (W19 Counter AA de Wiener Lab) adaptado para conteo de epimastigotes (gentileza de Wiener Lab). En ese caso, una alícuota de 100 µl de cultivo se diluyó con 100 µl de formaldehído 7,4 % en PBS y se colocó en el dispositivo. Los cultivos se consideraron

en fase exponencial temprana de crecimiento cuando contenían $0,5 - 1 \times 10^7$ parásitos/ml, en fase exponencial con $1 - 5 \times 10^7$ parásitos/ml y en fase exponencial tardía con $5 - 8 \times 10^7$ parásitos/ml.

IV.4.4 Congelado de cepas

Se empleó la técnica de criopreservación como método de almacenamiento de células a largo plazo con mínimos cambios fenotípicos. Para el caso de células bacterianas, a partir de una colonia repicada de una placa fresca, se inocularon 3 ml de cultivo LB líquido con el antibiótico apropiado y se incubó toda la noche (O.N.) a 37 °C con agitación constante (250 rpm). 1 ml de este cultivo se depositó en criovial estéril junto con 416 µl de glicerol 87 % v/v (concentración final: 25 % v/v). Se congeló a -80 °C. En el caso de células de levaduras se procedió de manera similar realizando el cultivo líquido en YPD o SCDO Glu debidamente suplementado e incubado O.N. a 30°C.

En el caso de *T. cruzi*, 1 ml de cultivo de epimastigotes saturado (100×10^6 parásitos/ml) se colectó por centrifugación a 3500 g durante 10 min y se resuspendió en igual volumen de SFB con DMSO 10 %. Esta mezcla se depositó en criovial y almacenó en Mr. Frosty™ (Nalgene™ Cryo 1 °C Freezing Container) mantenido a temperatura ambiente. El dispositivo Mr. Frosty, que permite el enfriamiento lento (-1 °C/min), se transfirió inmediatamente a -80 °C y transcurridas 12 h el criovial se depositó en cepario a -80 °C o, alternativamente, en tanque conteniendo nitrógeno líquido (-196 °C).

IV.5 Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos

Todas las soluciones de ADN fueron almacenadas a largo plazo a -20 °C en solución acuosa, a menos que se indique lo contrario.

IV.5.1 Purificación de ADN plasmídico

Las purificaciones de ADN plasmídico se realizaron a partir de cultivos de *E. coli* transformante de 5 - 10 ml crecidos O.N. a 37 °C en agitación en medio LB líquido suplementado con el antibiótico apropiado. Se utilizó el *kit* comercial Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) según las recomendaciones del fabricante, obteniendo el ADN en solución acuosa en un volumen de 100 µl.

IV.5.2 Determinación de la concentración de ADN

Para determinar la concentración de soluciones de ADN se realizaron medidas de Absorbancia a 260 nm (A_{260}). El valor de absorbancia a 260 nm fue utilizado para calcular la concentración de ADN según la relación de absorbancia igual a 1 para una solución de ADN 50 µg/ml (Sambrook y col., 1989). Las mediciones se efectuaron en espectrofotómetro estándar o, alternativamente, en equipo BioPhotometer plus (Eppendorf) a partir de 10 µl de la solución depositados en cubeta µCuvette G1.0.

IV.5.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

IV.5.3.1 Amplificación de las secuencias codificantes de *mtTcABCB.HISnonstop* y *TcCOX10.HISnonstop*

Las secuencias codificantes de TcCox10 y mtTcAbcB (ambas con cola de 6 histidinas en C-terminal) ya se encontraban disponibles en el laboratorio clonadas en los plásmidos pENTRTM3C y pGEM®-T Easy, respectivamente (Tabla I), los cuales fueron utilizados como molde para subsiguientes reacciones de amplificación.

Para obtener el fragmento *mtTcABCB.HISnonstop* las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen total de 50 µl conteniendo aproximadamente 50 ng de ADN plasmídico, los cebadores FPTcABCB-2 y RevHis-noStop2 de Tabla II en concentraciones 0,3 µM cada uno; cada desoxirribonucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) en 0,3 mM, MgSO₄ 1 mM y 1 U de *Pfx* platinum ADN Polimerasa (Invitrogen) con su correspondiente solución amortiguadora. Se siguió el siguiente programa de temperaturas realizando 30 repeticiones de las etapas 2, 3 y 4:

- 1- Desnaturalización inicial: 90 s a 94 °C
- 2- Desnaturalización: 15 s a 94 °C
- 3- Anillado: 30 s a 53 °C
- 4- Elongación: 2 min 30 s a 68 °C
- 5- Elongación final: 10 min a 68 °C.

Para el caso de *TcCOX10.HISnonstop* se procedió de manera similar utilizando los cebadores FP.TcCox10B y RevHis-noStop (Tabla II) y se aplicó el siguiente programa de temperaturas realizando 30 repeticiones de las etapas 2, 3 y 4:

- 1- Desnaturalización inicial: 90 s a 94 °C
- 2- Desnaturalización: 15 s a 94 °C

- 3- Anillado: 30 s a 53 °C
- 4- Elongación: 90 s a 68 °C
- 5- Elongación final: 10 min a 68 °C.

Los productos obtenidos, *mtTcABCB.HISnonstop* de 2246 pb y *TcCOX10.HISnonstop* de 1200 pb, se purificaron por electroforesis en gel de agarosa 1 % tras lo cual fueron digeridos con enzimas *BamH* I y *Xho* I, cuyos sitios de reconocimiento en 5' y 3' respectivamente de cada gen, fueron introducidos con los cebadores empleados en la reacción de PCR. Estos sitios permitieron el posterior clonado de cada inserto amplificado en un vector apropiado (pENTR™ 3C) digerido con las mismas enzimas.

La eliminación del codón de terminación en el extremo C-terminal de cada secuencia permitió que la secuencia que se clonase luego del sitio *Xho* I de la misma pudiese ser traducida junto con el gen de *T. cruzi* como un único polipéptido; en este caso se agregó una secuencia codificante de la proteína GFP (*GFP*).

IV.5.3.2 Amplificación de la secuencia codificante de GFP

La secuencia codificante de GFP con sitios *Xho* I en 5' y *Sal* I - *EcoR* V - *Xba* I en 3', se obtuvo por reacciones de PCR utilizando como molde el plásmido pTcGFPN (aproximadamente 10 ng de ADN) en un volumen total de 50 µl conteniendo además los cebadores FPpTcGFPN-3 y RPpTcGFPN-5 de Tabla II en concentraciones 0,3 µM cada uno; cada desoxirribonucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) en 0,3 mM, MgSO₄ 1 mM y 1 U de *Pfx* platinum ADN Polimerasa (Invitrogen) con su correspondiente solución amortiguadora. Se siguió el siguiente programa realizando 30 repeticiones de las etapas 2, 3 y 4:

- 1- Desnaturalización inicial: 2 min a 94 °C
- 2- Desnaturalización: 25 s a 94 °C
- 3- Anillado: 30 s a 58 °C
- 4- Elongación: 90 s a 68 °C
- 5- Elongación final: 10 min a 68 °C.

Se obtuvo como producto el fragmento *GFP* de 747 pb, que fue purificado por electroforesis en gel de agarosa y luego digerido con enzimas apropiadas para su clonado en los vectores pENTR3C.*mtTcABCB.HISnonstop* y

pENTR3C.*TcCOX10.HISnonstop*, entre los sitios *Xho* I del inserto ya presente (*-nonstop*) y *EcoR* V o *Xba* I del vector, respectivamente, quedando en fase con el inserto de interés.

Las secuencias de fusión resultantes *mtTcABCB.HIS-GFP* y *TcCOX10.HIS-GFP* poseían entonces los sitios *Sal* I - *EcoR* V - *Xba* I en 3' que, junto el sitio *BamH* I en 5', permitieron su posterior clonado en el vector pRS426M25 de expresión en levaduras y en el vector pTcINDEX de expresión en *T. cruzi*.

Todas las reacciones de PCR se efectuaron en un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient.

La obtención de los productos del tamaño adecuado, así como su cantidad, se verificó mediante análisis en geles de agarosa (1 % p/v).

IV.5.4 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Las diferentes muestras de ADN (plásmidos, fragmentos de restricción y productos de PCR) fueron resueltas mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa 1 % p/v, utilizando el sistema de tipo submarino (Sambrook y col., 1989). La solución de agarosa 1 % p/v se preparó en solución amortiguadora TAE (Tris:Acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8) y una vez fundida se agregó el colorante GelGreenTM Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) diluido 1/10000. Los marcadores de tamaño molecular empleados fueron λ *Hind* III (PB-L, Productos Bio-Lógicos), que consiste de ADN de fago λ digerido con la endonucleasa de restricción *Hind* III, y Ladder 100 bp (fragmentos de extremos romos de tamaños que van de 100 a 1500 pb y son múltiplos de 100 pb, más un fragmento adicional de 2080 pb).

Las muestras se suplementaron con Buffer de Siembra 6X (glicerol 30 % (v/v), xilencianol 0,25 % (p/v) y azul de bromofenol 0,25 % (p/v)) en una relación 5:1. Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo en buffer TAE empleando un voltaje constante de 80 V.

Los fragmentos de ADN fueron visualizados directamente por fluorescencia del agente intercalante utilizando un transiluminador de luz azul Safe Imager (Invitrogen). Los geles fueron digitalizados con cámara fotográfica digital Sony Cyber Shot DSC-H7 y las imágenes procesadas con los programas Adobe[®] Photoshop[®] CS5 o Image J.

IV.5.5 Purificación de bandas a partir de gel de agarosa

Para purificar fragmentos de ADN, las bandas fueron escindidas del gel de agarosa al 1 % p/v con bisturí tras lo cual se utilizó el *kit* comercial Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega) siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante. Se procedió según las especificaciones del producto, obteniendo el ADN en un volumen final de 50 µl.

IV.5.6 Digestión de ADN con enzimas de restricción

Para la digestión de los diferentes plásmidos y de los productos de PCR se emplearon las endonucleasas de restricción de Fermentas o Promega®. En general, las digestiones se llevaron a cabo durante 2 horas a 37 °C en las cantidades y medios de reacción recomendados por el proveedor.

IV.5.7 Ligación de fragmentos de ADN

Las reacciones de ligación de fragmentos de ADN se realizaron utilizando la enzima T4 ADN Ligasa (Fermentas) siguiendo las indicaciones y utilizando las soluciones amortiguadoras recomendadas por el fabricante. En general se trabajó sobre una relación molar inserto:vector 3:1 en un volumen final de 20 µl, conteniendo 10-20 ng de ADN en total; excepcionalmente en el caso de *mtTcABCB*, cuando su tamaño fue similar al del vector, se trabajó en una relación molar inserto:vector 1:1.

El inserto y el vector fueron previamente incubados a 65 °C por 5 min e inmediatamente colocados en hielo durante 10 min. Las mezclas de ligación conteniendo la enzima, el vector, el inserto y la solución amortiguadora adecuada se incubaron O.N. a 4 °C. Paralelamente se realizó un control de religación del vector en ausencia de inserto, incluyendo los mismos componentes de la mezcla y reemplazando el agregado de inserto por un volumen equivalente de H₂O_d estéril.

Posteriormente, las mezclas de ligación fueron utilizadas para la transformación de células bacterianas competentes.

IV.5.8 Preparación de células de *Escherichia coli* DH5α competentes y transformación

Tanto la obtención de células competentes de *E. coli* DH5α como su posterior transformación con plásmidos o mezclas de ligación se realizó por el método químico siguiendo el protocolo de Sambrook (Sambrook y col., 1989) con las modificaciones que se detallan a continuación. A partir de un cultivo bacteriano saturado (crecido

O.N.) se realizó una dilución 1/100 en medio líquido LB fresco y se incubó a 37 °C en agitación hasta alcanzar una $DO^{600} = 0,5$ (aproximadamente 2 h, en fase exponencial de crecimiento). Por cada evento de transformación, se tomó una alícuota de 1 ml del cultivo y se la centrifugó durante 5 min a 2500 x *g* a 4 °C. Una vez descartado el sobrenadante, las células se lavaron con 500 µl de CaCl₂ 0,1 M frío y estéril, y se centrifugaron nuevamente. Se volvió a descartar el sobrenadante y las células se pusieron en suspensión utilizando 100 µl de CaCl₂ 0,1 M frío y estéril. Posteriormente se añadió el ADN plasmídico (aproximadamente 20 ng) o la mezcla de ligación completa (contenidos en un volumen no mayor a 10 µl) y las células se incubaron en hielo durante 30 min en el caso del plásmido o 60 min en el caso de la mezcla de ligación. Como control negativo de la transformación, se agregó 10 µl de H₂O_d estéril en lugar de ADN. Luego, se las sometió a un choque térmico, el cual consistió en una incubación durante 90 s a 42 °C e inmediatamente se las colocó en hielo. Se agregó medio líquido LB con glucosa 1 % p/v y se incubaron las células a 37 °C durante 40 min. Finalmente, se sembraron en medio LB sólido suplementado con el antibiótico apropiado y se incubó por 12 h a 37 °C.

Las colonias obtenidas se analizaron por PCR para verificar la presencia del inserto deseado.

IV.5.9 PCR de colonia

Esta técnica se utilizó para diferenciar colonias transformantes que porten vector con inserto de aquellas que posean vector religado luego de una transformación con una mezcla de ligación. El protocolo de trabajo fue el siguiente:

a) Lisis bacteriana: se eligieron al azar aproximadamente 10 colonias de cada tipo de transformantes y 1 colonia de una placa control con bacterias sin transformar, las cuales fueron recogidas con palillos estériles y colocadas en tubos de microcentrifuga individuales conteniendo 150 µl de H₂O_d estéril. Con el mismo palillo se hizo inmediatamente una réplica en una nueva placa con LB sólido y el antibiótico de selección apropiado. Las muestras fueron incubadas por 15 min a 100 °C y 5 µl de éstas se usaron como molde en una reacción de PCR.

b) PCR: para la amplificación del ADN plasmídico de las células transformantes se tomaron 5 µL del sobrenadante de las bacterias lisadas a utilizar como molde de la

reacción. Paralelamente se hizo un control positivo con 1 µl de una dilución 1:10 de plásmido conteniendo la secuencia de interés en 4 µl de H₂O_d estéril. Los cebadores fueron utilizados en una concentración 0,5 µM cada uno. Además se utilizó: cada desoxirribonucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) en 0,2 mM, MgCl₂ 2 mM y 2,5 U de *Taq* ADN Polimerasa (Invitrogen) con su correspondiente solución amortiguadora, en 25 µl de volumen final de reacción. Los programas de amplificación fueron los mismos utilizados para amplificar el inserto blanco, excepto por la temperatura de extensión que fue de 72 °C debido a la polimerasa utilizada.

En el caso de verificar la presencia del inserto *TcCOX10* en alguna de sus versiones, se utilizaron los mismos cebadores usados en la amplificación con *Pfu* a menos que se indique lo contrario (Tabla II). Se siguió el siguiente programa realizando 30 repeticiones de las etapas 2, 3 y 4:

- 1- Desnaturalización inicial: 90 s a 94 °C
- 2- Desnaturalización: 15 s a 94 °C
- 3- Anillado: 45 s a 53 °C
- 4- Elongación: 90 s a 72 °C
- 5- Elongación final: 10 min a 72 °C.

En el caso de verificar la presencia del inserto *mtTcABCB* en alguna de sus versiones, se utilizaron los mismos cebadores usados en la amplificación con *Pfu* a menos que se indique lo contrario (Tabla II). Se siguió el siguiente programa realizando 30 repeticiones de las etapas 2, 3 y 4:

- 1- Desnaturalización inicial: 90 s a 94 °C
- 2- Desnaturalización: 15 s a 94 °C
- 3- Anillado: 30 s a 53 °C
- 4- Elongación: 2 min 30 s a 72 °C
- 5- Elongación final: 10 min a 72 °C.

Para verificar la presencia del inserto *GFP* se utilizaron los mismos cebadores que para su amplificación con *Pfu* (Tabla II) siguiendo el siguiente programa realizando 30 repeticiones de las etapas 2, 3 y 4:

- 1- Desnaturalización inicial: 2 min a 94 °C
- 2- Desnaturalización: 25 s a 94 °C
- 3- Anillado: 30 s a 58 °C

- 4- Elongación: 90 s a 72 °C
- 5- Elongación final: 10 min a 72 °C.

IV.5.10 Resolución de secuencias de ADN

Las reacciones de secuenciación de ADN fueron efectuadas por el servicio *DNA Sequencing Facility* de la Universidad de Maine, Orono, Maine, EE. UU. (<http://www2.umaine.edu/dnaseq/services/#sequencing>) sobre una muestra de ADN plasmídico. Las muestras se enviaron según las condiciones especificadas por dicho establecimiento (5 µl de ADN plasmídico de concentración 100 ng/µl y 3 µl de oligonucleótidos de concentración 5 µM).

Se utilizaron como cebadores los oligonucleótidos detallados en la Tabla III que hibridan sobre regiones que flanquean a los insertos según el plásmido utilizado.

Tabla III. Oligonucleótidos empleados para secuenciación.

| Vectores | Oligonucleótidos |
|----------|--|
| pENTR3C | ext-attL1 ⁶ : TAGTTAGTTACTTAAGCTCGGGC |
| | ext-attL2 ⁶ : CAGAGCTGCAGCTGGATGGC |
| pTcINDEX | FP_HX1: CTTTCCAACTTCTTTTATGATG |
| | RP_Ig.Act: CAAGGACAGAAAACGGTAAG |

Adicionalmente, en el caso de la secuenciación de los fragmentos fusión a *GFP*, se utilizaron los cebadores FSeqTcABCB6-1 para *mtTcABCB.HIS-GFP* y F2TcCox10 para *TcCOX10.HIS-GFP* (sección IV.2.2) que hibridan en 5' de la porción *HIS*.

Las secuencias fueron analizadas utilizando los programas ChromasLite versión 2.01 (Technelysium Pty Ltd, <http://technelysium.com.au/wp/chromas/>) y Clone Manager Suite7 version 7.11.

IV.5.11 Transformación de células de levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Las células de *S. cerevisiae* fueron sometidas a transformación por el método químico en presencia de Acetato de Litio (LiAc) (Gietz y Woods, 2002). Las levaduras se crecieron O.N a 30 °C con agitación en medio rico YPD. Luego, se hizo una dilución de 3 ml del cultivo O.N. saturado en 30 ml de medio líquido YPD (dilución 1/10) tal que la $DO^{600} = 1$ y se incubó durante 4 - 5 h en agitación hasta alcanzar una $DO^{600} = 4$. El

⁶ son secuencias que flanquean a los sitios *attL1* y *attL2*, respectivamente.

cultivo se centrifugó a 2500 x *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y las células se pusieron en suspensión utilizando 5 ml de solución de LiAc (Tris:HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM pH 8 y LiAc 0,1 M). Se repitió la centrifugación, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron utilizando la solución de LiAc residual. Por cada evento de transformación a realizar se agregó a un tubo de microcentrífuga 3 µl de ADN plasmídico (20 ng/µl), 60 µl de suspensión de células de levadura y 10 µl de ADN simple hebra *carrier* (ADN de esperma de salmón Sigma-Aldrich 10 mg/ml previamente hervido por 10 minutos y mantenido en hielo hasta su uso). Luego se añadió 0,45 ml de solución de PEG 40 % p/v (Tris:HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM pH 8, LiAc 0,1 M y PEG 3500 40 % p/v) y se incubaron las células a 30 °C por 40 minutos. Como control negativo de la transformación, se tomó siempre una alícuota extra de cultivo que se procesó igual que al resto, pero se agregó 10 µl de H₂O_d estéril en lugar del ADN. A continuación, se las sometió a un choque térmico durante 15 minutos a 42 °C seguido de la transferencia de las células a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron y se pusieron en suspensión utilizando 200 µl de YPD. Por último, las células se sembraron en medio selectivo (SCDO Glu sin el aminoácido correspondiente) y se incubaron a 30 °C por 2 - 3 días.

IV.5.12 Transfección de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Epimastigotes de *T. cruzi* Dm28c conteniendo el plásmido pLEW13 (Taylor y Kelly, 2006) disponibles en el laboratorio, se crecieron en LIT SFB 10 % suplementado con hemina 20 µM y G418 250 µg/ml a 28 °C a una densidad de cultivo de aproximadamente 3×10^7 células/ml. Las células se colectaron por centrifugación a $2000 \times g$ por 5 min, se lavaron 2 veces con PBS, se suspendieron a una densidad celular de 1×10^8 células en 0,4 ml de buffer de electroporación (PBS junto a MgCl₂ 0,5 mM y CaCl₂ 0,1 mM) y luego las células se transfirieron a una cubeta de 0,2 cm de paso. El buffer de transfección fue preparado con 150 - 300 µl de las purificaciones de ADN plasmídico (15 - 30 µg total de plásmido derivado de pTcINDEX) utilizando el *kit* comercial Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), 40 µl de PBS 10X, 4 µl de MgCl₂ 50 mM y 4 µl de CaCl₂ 10 mM y completado con H₂O_d hasta un volumen de 400 µl. La mezcla se colocó en hielo por 15 min y luego se le aplicó un pulso de 450 V y 500 µF usando un electroporador GenePulser II (Bio-Rad, Hercules,

EE.UU.). Luego, las células se transfirieron a una botella de cultivo de 25 cm² de superficie con 3 ml de LIT SFB 10 % suplementado con hemina 20 µM y G418 250 µg/ml, y se incubaron a 28 °C. Una muestra de epimastigotes se sometió al mismo protocolo de transfección pero sin ADN, como control negativo. A las 48 h, se agregó Hyg a una concentración inicial de 50 µg/ml. Luego de 72 – 96 h, los cultivos se mantuvieron por diluciones periódicas y se llevó gradualmente a una concentración final de Hyg 200 µg/ml. Se obtuvieron líneas estables después de 30 – 45 días de la transfección, cuando las mismas recuperaron la velocidad normal de crecimiento (tiempo de duplicación de 24 – 36 h) y el control negativo dejó de crecer.

IV.6 Técnicas de manipulación de proteínas

IV.6.1 Cuantificación de proteínas por método de Bradford

Las concentraciones proteicas de los extractos se estimaron utilizando el método colorimétrico Protein Assay (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la curva patrón se utilizaron diluciones de una solución de albúmina sérica bovina (BSA) de 1 mg/ml.

IV.6.2 Electroforesis SDS-PAGE de proteínas

La separación de proteínas mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida (PAGE, *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) se realizó en condiciones reductoras y desnaturizantes en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS); técnica denominada SDS-PAGE (Sambrook y col., 1989). Las muestras de proteína fueron diluidas en Solución de Siembra 5X (Tris-HCl 100 mM pH 6,8, glicerol 25 % v/v, SDS 10 % p/v, β-ME 0,5 % v/v, azul de bromofenol 0,5 mg/ml) en una proporción 4:1 (Bollag y col., 1996). Dependiendo el origen de las muestras se hicieron distintos tratamientos: extractos proteicos bacterianos se hirvieron durante 5 min, extractos mitocondriales o totales de levadura se calentaron 30 min a 50 °C, extractos totales de *T. cruzi* se calentaron 15 min a 42 °C. El marcador PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas®), cuyas bandas son de tamaños de 250, 130, 95, 72, 55, 36, 28, 17 y 10 kDa, se utilizó para estimar los pesos moleculares.

Las muestras y el marcador de masa molecular se sembraron en calles separadas de un gel discontinuo (Laemmli, 1970); las concentraciones finales de

poliacrilamida en los geles de concentración y de separación utilizadas fueron 4 % p/v y 12 % p/v, respectivamente.

El sistema de electroforesis empleado fue el Mini-PROTEAN III® (Bio-Rad). La corrida se realizó utilizando la solución amortiguadora Laemmli (Tris 0,3 % p/v, glicina 1,44 % p/v y SDS 0,1 % p/v pH 8,3) (Bollag y col., 1996), aplicando una corriente constante de 25 mA por gel de 1 mm de espesor. Luego de la corrida los geles fueron revelados mediante tinción de proteínas totales con una solución de Azul Brillante de Coomassie R-250 al 1 % p/v en etanol:ácido acético:agua (50:10:40), previa fijación por incubación durante 5 min en solución decolorante (etanol 30 % v/v, ácido acético 10 % v/v, agua 60 % v/v). Alternativamente, se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa con el fin de realizar ensayos de Western blot.

IV.6.3 Western blot

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham) utilizando el sistema Mini-Trans-Blot transfer (Bio-Rad). La transferencia se realizó con agitación permanente en baño de agua-hielo durante 90 min a 350 mA. La solución de transferencia empleada consistió en Tris:HCl 25 mM pH 8, glicina 192 mM y metanol 20 % v/v. Concluida la transferencia, se la eficiencia del proceso por tinción reversible con el colorante Rojo Ponceau. Luego de lavar con H₂O_d, se llevó a cabo el bloqueo de la membrana incubando la misma con solución amortiguadora PBS-T leche (PBS conteniendo Tween-20 0,1 % v/v y leche descremada en polvo al 5 % p/v) durante 60 min con agitación suave a temperatura ambiente ó 2 - 4 h a 4 °C. Posteriormente la membrana se incubó O.N. a 4 °C en agitación suave (o 2 horas a temperatura ambiente) con una dilución del anticuerpo primario correspondiente en una solución de PBS-T. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-His (Calbiochem, 100 µg/ml, obtenidos de ratón) en una dilución 1/200, anti-His (GE Healthcare, 100 µg/ml, obtenidos de ratón) en una dilución 1/3000, anticuerpos policlonales de conejo anti-TcCox10 purificados y concentrados en una dilución 1/200, anticuerpos policlonales de conejo anti-TcAbcB purificados y concentrados en una dilución 1/200, anticuerpos de conejo anti-GFP (Santa Cruz Biotechnology) en una dilución 1/1000, anticuerpos monoclonales de ratón anti-tubulina clon TAT-1 en una dilución 1/1000 (donado por K. Gull, Universidad de

Oxford, Inglaterra), anticuerpos de conejo anti-triparredoxina peroxidasa mitocondrial de *T. cruzi* (TcmPx) (Nogueira y col., 2009) en una dilución 1/5000 (donado por Sergio Guerrero, UNL, Argentina), anticuerpos policlonales de conejo anti-subunidad β del complejo F1 de la ATPasa mitocondrial de *S. cerevisiae* en una dilución 1/3500 (donado por A. Tzagoloff, Universidad de Columbia, EE.UU.) y anticuerpos anti-hemoperoxidasa ascorbato dependiente (TcAPX) de retículo endoplasmático (Wilkinson y col., 2002) en una dilución 1/5000. Posteriormente se realizaron 4 lavados de 5 min con PBS-T leche en agitación suave para eliminar los anticuerpos no unidos a la membrana y se incubó la misma con el anticuerpo secundario correspondiente durante 2 horas a 4 °C en agitación suave preparados en una solución de PBS-T. Se utilizaron anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados a la enzima peroxidasa HRP (Calbiochem, 133 μ g/ml, obtenidos de cabra) diluidos 1/3500 en buffer PBS-T o anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados a peroxidasa HRP (Calbiochem, 133 μ g/ml, obtenidos de cabra) en una dilución 1/10000. Seguidamente, se efectuaron 4 lavados de 5 min con la solución de lavado (PBS-T o PBS).

La detección de las señales correspondientes a las proteínas de interés se realizó mediante el método quimioluminiscente. Se emplearon los *kits* comerciales ECL Prime Western Blotting Detection kit (GE Healthcare) o SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate de Pierce, siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Las membranas se incubaron 5 min con los reactivos comerciales mencionados y luego fueron expuestas entre 10 s a 30 min frente una placa autorradiográfica. Luego la placa se incubó 2 min en la solución de revelado (Kodak) y luego de lavar con H₂O_d, se incubó 2 min en la solución fijadora. Finalmente se enjuagó la placa autorradiográfica con H₂O_d y se dejó secar.

Las imágenes fueron procesadas con el programa ImageJ (Schneider y col., 2012).

Con el fin de reutilizar las membranas de nitrocelulosa para detectar las mismas proteínas con otro anticuerpo (que reconozca un epítopo distinto) u otras proteínas distintas, estas fueron tratadas con soluciones de disrupción del complejo antígeno-anticuerpo (soluciones de *stripping*). Se utilizaron dos tratamientos alternativos: una incubación de 30-60 min a temperatura ambiente u O.N. a 4 °C con una solución con glicina 100 mM, NaCl 100 mM, pH 3 (tratamiento suave), o 30 min a 50 °C con una

solución conteniendo β -mercaptoetanol 100 mM, SDS 2 % y Tris:HCl 62,5 mM pH 6,7 (tratamiento fuerte). En ambos casos, luego del tratamiento con las respectivas soluciones, se procedió a lavar la membrana con PBS-T y se bloqueó la misma utilizando PBS-T leche. Se hizo un control de *stripping* incubando con anticuerpo secundario y revelando o incubando directamente con las soluciones de revelado. Finalmente se incubó con los anticuerpos alternativos y se repitió el resto de la técnica de Western blot.

IV.6.4 Purificación de anticuerpos anti-TcCox10 y anti-mtTcAbcB a partir de suero inmune

Durante el trabajo de Tesina de grado del Dr. Simón Menéndez Bravo, se obtuvieron las proteínas recombinantes GST-P2(TcAbcB).His y GST-P2(TcCox10).His, compuestas por un péptido antigénico proveniente de la proteína en cuestión (el denominado P2(TcAbcB) de aproximadamente 32,7 kDa y P2(TcCox10) de 15 kDa, respectivamente)⁷ fusionado a GST (25kDa) por el extremo N-terminal y con cola de 6 histidinas en C-terminal, y ambos con un sitio de reconocimiento para trombina en la región de fusión a GST. Estas construcciones se expresaron en *E. coli* y purificaron. Además, en el laboratorio contábamos con sueros antigénicos de conejos que habían sido previamente inmunizados con cada proteína de fusión, de manera individual. Estos fueron obtenidos en el servicio de bioterio de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la UNR, donde se siguieron los protocolos de inmunización aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, resolución número 935/2015 (Menéndez Bravo, 2011).

Para obtener anticuerpos policlonales específicos purificados a partir de suero inmune, se utiliza el siguiente protocolo general: Primero, se debe digerir la fusión GST-péptido P2 con trombina durante 2 h a 26 °C en buffer NaCl 150 mM, CaCl₂ 2,5 mM en una relación de 1 μ g de trombina por cada 100 μ g de proteína a digerir. Luego, se realiza una electroforesis de la proteína de fusión digerida en un SDS-PAGE a una concentración de acrilamida del 14 % p/v, se electrotransfiere a una membrana de nitrocelulosa, se visualizan las proteínas separadas mediante tinción reversible con el colorante Rojo Ponceau y se corta el área de la membrana correspondiente al péptido

⁷ El dominio P2(TcAbcB) corresponde a la región C-terminal soluble – los últimos 236 aminoácidos de mtTcAbcB. El dominio P2(TcCox10) corresponde a los últimos 30 aminoácidos de la proteína.

de interés. Se necesitan al menos 50 µg del péptido adherido a la membrana de nitrocelulosa. La misma se lava luego 4 veces con 1,5 ml de PBS, se incuba con PBS-T leche durante 1 h a temperatura ambiente y se lava 4 veces más con PBS.

La membrana conteniendo el péptido se incuba con 500 µl de suero inmune durante 1 hora a 37 °C en agitación suave. Luego, se lava la membrana 3 veces con PBS y se incuba con 0,5 ml de la solución de elución de anticuerpos (glicina 100 mM, NaCl 100 mM, pH 3) durante 1 min a temperatura ambiente con agitación vigorosa. Esto último se repite 3 veces. Finalmente, la membrana se lava 3 veces con PBS y se repite el procedimiento sucesivas veces. Las fracciones de elución conteniendo los anticuerpos purificados se colectan, neutralizan inmediatamente por medio del agregado de una solución de Tris:HCl 1 M pH 8 equivalente a 1/10 del volumen total y se concentran en una única solución de menor volumen.

En el caso de TcAbcB no se pudo obtener el péptido P2(TcAbcB).His escindido de la porción GST por lo que se siguió un protocolo alternativo que consistió en incubar el suero inmune con membranas conteniendo sólo la proteína GST. De esta manera se eliminan en un primer paso aquellos anticuerpos específicos contra esta porción de la fusión, y luego se reutiliza el suero, ahora denominado "Recirculado", para obtener los anticuerpos anti-TcAbcB en una segunda ronda de purificación, utilizando la proteína de fusión GST-P2(TcAbcB).His adherida a membrana de nitrocelulosa. Los eluatos se colectaron en la 2da purificación y se procedió a su neutralización y concentración de la manera antes descripta. En el caso de TcCox10, ya se contaba con la membrana de nitrocelulosa con péptido P2(TcCox10) liberado de su porción GST y adherido⁸. Ésta se utilizó entonces para obtener anticuerpos policlonales anti-TcCox10 a partir de suero inmune, según el protocolo general realizando una única etapa de purificación.

Para concentrar los anticuerpos purificados se utilizaron dispositivos centrífugos Amicon Ultra® con un valor de corte de 10 kDa, en su versión de 15 ml. La solución de anticuerpos se colocó en el compartimiento superior del dispositivo, se concentró mediante centrifugación a 2000 x g y a 4 °C en una centrífuga refrigerada y se descartó la solución filtrada del compartimiento inferior. Se recuperó un volumen de anticuerpos unas 15 veces menor al volumen inicial y se almacenó a -20 °C hasta su

⁸ Trabajo realizado durante la Tesina de grado de Lucía V. Ferrero (Ferrero, 2014).

uso. El proceso de concentración se verificó por medidas de absorbancia en el espectro comprendido entre 240 y 320 nm de las soluciones de anticuerpos antes y después de ser centrifugados utilizando una cubeta de cuarzo.

El resultado de la purificación se evaluó por medio de un ensayo de Western blot en el que se sembraron los controles adecuados (un extracto de *E. coli* DH5 α , un extracto de *E. coli* BL21(DE3)pLysS' que sobreexpresa la proteína GST (ambos como controles negativos) y un extracto de *E. coli* BL21(DE3)pLysS' que sobreexpresa GST-péptido como control positivo), disponibles en el laboratorio. Como anticuerpo primario se utilizaron diferentes diluciones de la solución de anticuerpos purificados obtenida en forma concentrada.

Por último, los anticuerpos purificados y concentrados se diluyeron al ½ con igual volumen de glicerol 100 % y se almacenaron a -20 °C, quedando disponibles para su uso en ensayos de Western blot e Inmunofluorescencia indirecta.

Al finalizar, cada membrana conteniendo el péptido de interés se lavó con PBS y se guardó en 30 % v/v de etanol a 4 °C para su posterior reutilización.

IV.6.5 Obtención de extractos proteicos totales de *Saccharomyces cerevisiae*

Para la obtención de extractos proteicos totales de células de levadura, el protocolo consistió de los pasos siguientes: Se creció un cultivo de 10 ml O.N. en SCDO Glu sin los aminoácidos correspondientes hasta $DO^{600} = 1$. Al día siguiente se colectó por centrifugación a 300 x *g* durante 10 min y resuspendió en 500 μ l de buffer de lisis frío (Tris:HCl 20 mM pH 8, NH₄OAc 50 mM, EDTA 2 mM) conteniendo inhibidores de proteasas (PMSF- fluoruro de fenilmetilsulfonilo, Traslyol, Genzamida) al doble de la concentración de trabajo. Esta solución se utilizó para homogeneizar el pellet celular (relación 1:1 de volúmenes), por agitación durante 30 s con *vortex* en presencia de pequeñas esferas de vidrio (0,4 - 0,5 mm de diámetro, previamente lavadas con una solución diluida de ácido nítrico al 5 % v/v, enjuagadas con abundante H₂O_d y luego secadas). Se repitió 4 veces el proceso, tras lo cual se separó el sobrenadante por centrifugación (10 min a 16000 *g*). Se lavaron las esferas con otros 500 μ l de TCA frío y se sometió a *vortex* 2 veces más por 30 s cada vez, se tomó el sobrenadante y se juntó con el separado en el paso anterior. Se centrifugó todo el sobrenadante por 10 min en frío a 16000 x *g*, se retuvo el pellet y descartó este nuevo sobrenadante. El pellet se

resuspendió en 150 μ l de buffer TCA-Laemmli con inhibidores de proteasas y se hirvió durante 10 min. Luego se centrifugó 10 min a velocidad máxima y tomó este último sobrenadante, que se almacenó hasta su análisis a -20°C .

IV.6.6 Preparación de extractos mitocondriales crudos de *Saccharomyces cerevisiae*

Para la obtención de extractos mitocondriales crudos de levadura, se siguió el protocolo propuesto por Diekert y colaboradores (Diekert y col., 2001) con algunas modificaciones que se detallan a continuación. Las levaduras se crecieron a 30°C con agitación en medio sintético selectivo SCDO Glu (con los aminoácidos correspondientes) O.N.. Luego, se hizo una dilución del cultivo O.N. saturado en 200 ml de medio sintético selectivo (SCDO Glu o Gal, con los aminoácidos correspondientes, utilizando diferentes concentraciones de Met) tal que la DO^{600} sea aproximadamente 0,15 - 0,3 y se incubó durante 16 - 24 h en agitación a 30°C hasta alcanzar una $\text{DO}^{600} = 8 - 9$. Se recolectaron las células por centrifugación a $3000 \times g$ durante 15 minutos a 8°C . Se lavaron las células con H_2O_d y se volvieron a centrifugar. El pellet se lavó nuevamente y se trasvasó a tubos descartables de 50 ml. Finalmente, se realizó una última centrifugación a $3000 \times g$ durante 15 minutos a 8°C , se descartó el sobrenadante y se determinó el peso húmedo del pellet de células obtenido (normalmente se obtuvieron aproximadamente 2 g).

Las células se pusieron en suspensión utilizando la solución amortiguadora SHP fría (manitol 0,6 M, Tris:HCl 20 mM pH 7,5 y PMSF 1 mM), en una densidad aproximadamente de 0,2 g células/ml. A cada tubo se le agregaron esferas de vidrio hasta ocupar un volumen final de 3 ml. Luego, se realizó la ruptura mecánica de las células por agitación vigorosa con *vortex* durante 1 minuto a máxima velocidad. Esto se repitió 5 veces incubando en hielo entre cada paso de ruptura. La suspensión resultante se centrifugó a baja velocidad ($600 \times g$) durante 5 minutos. El sobrenadante -que contiene mitocondrias, membranas celulares y citosol- fue transferido a un tubo limpio. El pellet remanente (células enteras) fue sometido nuevamente a ruptura mecánica y centrifugación a baja velocidad, y el sobrenadante resultante se colocó junto con la fracción anterior. Luego, cada muestra se centrifugó a $1200 \times g$ por 10 minutos y el sobrenadante se pasó a un nuevo tubo. Con este sobrenadante se repitió la centrifugación a $1200 \times g$ por 10 minutos y el sobrenadante obtenido, que posee la

fracción citosólica y mitocondrial, se colocó en tubos apropiados para centrifuga de alta velocidad. Seguidamente, se centrifugó a $16100 \times g$ durante 45 minutos a 8°C , se descartó el sobrenadante y el pellet -que contiene mitocondrias- se puso en suspensión utilizando 200 μl de solución amortiguadora SHP. Estas se conservaron a -80°C en fracciones de 40 μl hasta su utilización.

IV.6.7 Digestión con Proteinasa K de extractos mitocondriales de levadura

Para determinar la orientación del extremo terminal de proteínas presentes en membrana mitocondrial de levaduras se procedió a ensayar un protocolo de digestión controlada de mitocondrias aisladas con Proteinasa K (Promega) en 3 condiciones: intactas, desprovistas de membrana externa y disgregadas por completo (Boldogh y Pon, 2007). La actividad de la proteasa se determinó en función de la desaparición de señal de etiquetas apropiadamente ubicadas en los extremos terminales que, si no fuesen digeridas, darían señal en un Western blot.

Para ello, mitocondrias aisladas de levaduras (5 mg/ml), obtenidas según el protocolo anterior (IV.6.6) en ausencia de inhibidor de proteasa, se analizaron inmediatamente tras su obtención, dividiendo cada muestra en 6 tubos con 0,05 mg de proteína total en cada uno. En el primer par de tubos (mitocondrias intactas) las mitocondrias se diluyeron al 1/10 en buffer SH. En el segundo par de tubos el tratamiento consistió en diluir al 1/10 las mitocondrias en HEPES 20 mM pH 7,4, condición que rompe selectivamente la membrana externa. En el tercer par de tubos se produjo la disgregación total de ambas membranas mitocondriales por agregado de Tritón X-100 al 0,2 % v/v. Luego de este tratamiento, a un tubo de cada par se le colocó proteasa (50 μg) mientras que al otro no, y se dejó actuar durante 20 minutos en hielo, tras lo cual la acción de la proteasa se detuvo por inactivación por agregado de PMSF.

Finalmente se adicionó ácido tricloroacético 12 % frío que precipita las proteínas y contribuye ulteriormente a la inactivación de la proteasa. Las muestras así tratadas se colectaron por centrifugación durante 30 min a $13000 \times g$ tras lo cual se descartó el sobrenadante. Al pellet se agregó 0,5 ml de acetona fría y se volvió a centrifugar 30 min a 4°C y $13000 \times g$. Se descartó el sobrenadante y dejó evaporando el solvente en campana. Por último, se resuspendieron las muestras en buffer SHP con buffer de siembra y se calentaron 20 min a 45°C . Luego se separaron en un SDS-PAGE y

transfirieron a membrana de nitrocelulosa para ser analizadas por Western blot. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-TcCox10, anti-GFP, anti-His y anti-subunidad β de F1-ATPasa (sección IV.6.3).

IV.6.8 Obtención de extractos celulares totales de epimastigotes

Epimastigotes de *T. cruzi* salvajes o transfectados con construcciones de pTcINDEX mantenidos en fase exponencial de crecimiento en LIT SFB 10 % suplementados con hemina 20 μ M a 28 °C, fueron colectados mediante centrifugación a 2000 x *g* durante 5 min. En el caso de los transfectantes, se agregó además Hyg 200 μ g/ml y fueron inducidos con Tet (concentraciones de 0,05 a 0,5 μ g/ml). Luego fueron lavados 2 veces con PBS y resuspendidos en buffer de lisis (Tris:HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 50 mM, EDTA 5 mM, Tritón X-100 0,1 % v/v, PMSF 1 mM y mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma)) a razón de 0,5 - 1 x 10⁶ parásitos/ μ l. Todas las muestras se congelaron a -80 °C hasta su utilización.

IV.6.9 Fraccionamiento de extractos totales de epimastigotes por centrifugación diferencial

Para obtener fracciones subcelulares de epimastigotes de *T. cruzi* se siguió el protocolo de Morales y colaboradores (Morales y col., 2009) con algunas modificaciones. A partir de un cultivo de 200-400 ml, se colectaron parásitos en fase de crecimiento exponencial, a 2000 x *g* por 10 minutos. Se lavaron dos veces con tampón de homogeneización (Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 1mM, sacarosa 0,25 M y PMSF 1 mM) y se resuspendieron en 1 ml de la misma solución. Los parásitos fueron lisados por abrasión en un mortero frío conteniendo la mezcla de parásitos con carburo de silicio (600 mesh) en una relación 1:1. El lisado se diluyó 1/5 con tampón de homogeneización y se centrifugó a 100 x *g* durante 10 minutos para remover el carburo de silicio. El homogenado luego se sometió a una centrifugación diferencial: a 600 x *g* durante 10 min, a 1000 x *g* durante 15 minutos se obtuvieron los núcleos y las células sin romper (fracción N), a 5000 x *g* durante 15 minutos se obtuvieron los gránulos grandes (fracción GG), a 13500 x *g* durante 20 min, a 21460 x *g* durante 20 minutos para obtener los gránulos pequeños (fracción GP) y a 48500 x *g* durante 1 hora en una ultracentrífuga Beckmann con el rotor Ti 90, se obtuvieron los microsomas y glicosomas (fracción M) (adaptado de Oppenheimer y col., 1977).

Finalmente, todos los sedimentos se resuspendieron con 100 µl de solución tampón de lisis Urea (Hepes 20 mM pH 8, Urea 8 M).

IV.7 Estudio de expresión de genes recombinantes de *Trypanosoma cruzi*

IV.7.1 Ensayo de complementación en el sistema heterólogo *Saccharomyces cerevisiae*

IV.7.1.1 Por estriado

Para este ensayo se prepararon placas con 20 ml de medio SCDO sólido, con diferentes fuentes de carbono y el correspondiente agregado de aminoácidos. Las levaduras se repicaron por estriado en cada una de las condiciones a ensayar.

IV.7.1.2 Drop Test

Este tipo de ensayo es similar al anterior pero permite una comparación cuantitativa del nivel de crecimiento observado dado que los cultivos se siembran a igual cantidad inicial de células cada uno. En este caso, también se prepararon placas con medio sólido de las condiciones a ensayar y las células de *S. cerevisiae* transformadas con las diferentes construcciones se cultivaron en 5 ml de medio SCDO Glu sin el aminoácido correspondiente para la selección por auxotrofía y a 30 °C en agitación por aproximadamente 18 horas (O.N.). Al otro día se midió la DO^{600} de cada cultivo y se hizo una dilución en H_2O_d estéril en volumen final de 1 ml de modo que la DO^{600} de esta dilución inicial sea igual a 1. Luego, a partir de éstas se realizaron 4 diluciones seriadas 1/10 también en H_2O_d estéril. Se sembraron gotas de 7 µl de cada dilución en las placas de cada condición en una forma que luego permita la comparación. Es así que las siembras se dispusieron en filas y columnas alineadas, en cada fila una cepa siguiendo un orden decreciente de DO^{600} y de manera que, en cada columna, se usara la misma dilución para las distintas cepas. Se incubaron a 30 °C hasta lograr crecimiento.

En el caso de las placas con medio SCDO Glu, se observó crecimiento de las levaduras después de 1 día de incubación, mientras que con las placas con medio SCDO Gli-EtOH se necesitaron normalmente al menos 3 días para observarlo. Las fotos de las placas con SCDO Glu fueron tomadas habitualmente al día 2 o 3 de crecimiento y con SCDO Gli-EtOH entre el día 5 y 8 de crecimiento. Las imágenes fueron procesadas con el programa ImageJ (Schneider y col., 2012). Cada imagen fue convertida en escala

de grises, se corrigió el ruido de fondo (*background*), el brillo y el contraste, y se invirtieron los colores para una mejor visualización del crecimiento de las gotas de cultivo sembradas.

IV.7.2 Mediciones de consumo de oxígeno

Para evaluar la capacidad respiratoria de cultivos celulares de *S. cerevisiae* se realizaron mediciones del consumo de oxígeno de estas células utilizando un electrodo de Clark conectado a un oxígrafo YSI *model 5300 Biological Oxygen Monitor* previamente calibrado y se registró la disminución de oxígeno del medio mediante el sistema de registrador REC 111 Amersham Pharmacia Biotech conectado al mismo.

En el caso de las levaduras transformadas con las construcciones de pRS426M25, las muestras se prepararon a partir de 8 ml de cultivos crecidos O.N. a 30 °C en SCDO Glu suplementado con Met 10 mg/l y sin Ura. Como control se utilizaron cultivos de *S. cerevisiae* silvestre crecidas de manera similar. Se centrifugaron 10 min a 3000 x *g*, se lavaron con 3 ml glicerol 3 % v/v y finalmente se resuspendieron con 1 ml de la misma solución. En este punto se tomó una muestra para medir la DO⁶⁰⁰ de la suspensión a utilizar. En la cámara de reacción del oxígrafo se colocó 1,9 ml de solución de glicerol 3 % y se registró el 100 % de oxígeno. Luego se agregó 50 - 100 µl de la muestra preparada y se registró el porcentaje de oxígeno disuelto en el medio a 30 °C durante 2 – 5 min. Se hicieron al menos 2 agregados más de la muestra y se registró nuevamente el porcentaje de oxígeno disuelto en el medio también durante 2 – 5 min. Se verificó el proceso de respiración mediante la inhibición del consumo de oxígeno con el agregado de 2 µl de azida de sodio 1 M (inhibidor de la enzima CcO).

Las velocidades de consumo de oxígeno se calcularon a partir de los valores de las pendientes de las rectas obtenidas al graficar porcentaje de oxígeno disuelto en función del tiempo y multiplicado por un factor que incluye la concentración de oxígeno disuelto en equilibrio con el aire a la temperatura de trabajo: 237 nmoles O₂/ml a 28 °C y 230 nmoles O₂/ml a 30 °C (datos de Walker, 1987). Los valores calculados se normalizaron por las medidas de DO⁶⁰⁰ de cada cultivo celular (Zee y Glerum, 2006).

IV.8. Microscopía

IV.8.1 Observación de células de levadura que contienen GFP recombinante

Para observar por microscopía de fluorescencia muestras de levaduras transformadas con las construcciones pRS426M25.*TcCOX10.HIS-GFP*, pRS426M25.*mtTcABCB.HIS-GFP*, pRS426M25.*TcHTE.HIS-GFP* o pRS414M25.*mtTcABCB.HIS-GFP*, se procedió de la siguiente manera. Se tomó 1 ml de cultivo O.N. de las levaduras crecidas en medio SCDO suplementado con una fuente de carbono, Met 20 mg/l y sin el aminoácido correspondiente para la selección por auxotrofia a 30 °C, se lavó con PBS, se dejó adherir en portaobjetos cubiertos con polilisina durante 20 min, se fijaron las células con formaldehído 3,7 % p/v durante 20 min y se lavaron con PBS. Finalmente se montaron utilizando líquido de montaje VectaShield (Vector Laboratories). Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal Nikon Eclipse TE-2000-E2 utilizando el programa Nikon EZ-C1. Las imágenes se procesaron con el programa ImageJ (Schneider y col., 2012). A cada imagen se corrigió el ruido de fondo (*background*), el brillo y el contraste.

IV.8.2 Tinción mitocondrial en epimastigotes

Los epimastigotes fueron mantenidos en fase exponencial de crecimiento en LIT SFB 10 % suplementado con hemina 20 µM a 28 °C y en el caso de parásitos transfectantes inducidos con Tet (0,05 a 0,5 µg/ml). Estos fueron colectados por centrifugación a 2000 x *g*, lavados dos veces con PBS y suspendidos en 100 µL de PBS con MitoTracker 1 µM (Invitrogen) por cada 10 x 10⁶ células. Después de 60 min a 28 °C, las células se lavaron con PBS y se fijaron con 500 µl de formaldehído 3,7 % p/v en PBS a temperatura ambiente durante 10 min. Se lavaron nuevamente con PBS. Las células se adhirieron a portaobjetos (pretratados con polilisina) durante 20 min, se lavaron con PBS y finalmente se montaron utilizando líquido de montaje VectaShield (Vector Laboratories). Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal Nikon Eclipse TE-2000-E2 utilizando el programa Nikon EZ-C1. Las imágenes se procesaron con el programa ImageJ (Schneider y col., 2012). A cada imagen se le corrigió el ruido de fondo (*background*), el brillo y contraste.

Se utilizó el MitoTracker Orange CMTMRos (M7510 de Invitrogen). Tiene una longitud de onda de excitación de 554 nm y una longitud de onda de emisión de 576 nm. El *stock* se preparó 1 mM en DMSO y se guardó al abrigo de la luz a -20 °C.

IV.8.3 Técnica de Inmufluorescencia Indirecta (IFI) en epimastigotes

Se utilizaron para este ensayo epimastigotes marcados con Mitotracker como se describe en la sección anterior. Luego de ser adheridas las células a los portaobjetos (pretratados con polilisina) durante 20 min, se lavaron con PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 0,1% v/v en PBS durante 10 min. Luego se incubaron con Solución Universal de Inmunofluorescencia (UIB - Tween-20 0,1% v/v, Tris 150 mM pH 7,5 y NaCl 150 mM) con BSA (albumina sérica bovina) 1% p/v durante 30 min. Posteriormente se incubó con anticuerpos primarios policlonales de conejo anti-TcCox10 purificados y concentrados (sección IV.6.4) (dilución 1/40) en UIB con BSA 1% p/v durante 2 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos no unidos se removieron mediante 3 lavados con UIB y luego se incubaron con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugados con FITC (isotiocianato de fluoresceína) (Jackson Immuno Research, dilución 1/100) y con 1 μ M DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) en UIB durante 1 h a temperatura ambiente al abrigo de la luz. Posteriormente los preparados se lavaron 3 veces con PBS-T y finalmente se montaron utilizando líquido de montaje VectaShield (Vector Laboratories). Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal Nikon Eclipse TE-2000-E2 utilizando el programa Nikon EZ-C1. Las imágenes se procesaron con el programa ImageJ (Schneider y col., 2012). A cada imagen se corrigió el ruido de fondo (*background*), el brillo y el contraste.

V- Resultados y Discusión

V.1 La proteína mtTcAbcB y su posible rol en el transporte mitocondrial de hemo

T. cruzi debe incorporar el hemo desde el medio externo, y transportarlo a los diferentes compartimentos subcelulares (Korený y col., 2010). Ensayos realizados en epimastigotes han demostrado que la incorporación de hemo procedería vía un transportador de membrana específico, cuya actividad es bloqueada por la presencia de inhibidores de transportadores tipo ABC (Cupello y col., 2011; Lara y col., 2007). Además, en nuestro laboratorio, se ha demostrado que este transporte ocurriría en los estadios replicativos (Merli y Pagura y col., 2016). Por otro lado, se ha demostrado que la actividad respiratoria es esencial a lo largo del ciclo de vida de *T. cruzi* (Silva y col., 2011; y Merli y col., 2017), por lo tanto debe existir algún mecanismo, para ingresar el hemo a esta organela de manera de poder ser utilizado por las distintas hemoproteínas de la cadena respiratoria mitocondrial. Hasta la fecha no se han descrito proteínas que puedan actuar como chaperonas mediando la distribución intracelular de hemo en organismos eucariotas en general, ni tampoco en tripanosomátidos.

Como organismo modelo para el estudio de procesos biológicos y fisiológicos de otros eucariotas más complejos se ha utilizado históricamente a *S. cerevisiae*. Además, en nuestro laboratorio hemos tenido éxito cuando lo utilizamos para realizar la primera caracterización de las enzimas de la síntesis de hemo A de *T. cruzi* (Buchensky y col., 2010) y en la asignación del rol en el transporte de hemo a la proteína TcHTE (Merli y Pagura y col., 2016). En este trabajo nos propusimos utilizar esta levadura para tratar de elucidar el rol de la proteína de *T. cruzi* mtTcAbcB como posible transportador de hemo mitocondrial del parásito. Vale recordar que, a diferencia de *T. cruzi*, *S. cerevisiae* es capaz de sintetizar el grupo hemo; sin embargo, no se han identificado las proteínas responsables del transporte y distribución intracelular de este cofactor. Por ejemplo, se desconoce el transportador responsable de incorporar el precursor COPRO III hacia el interior de la mitocondria (el cual sería un ortólogo a ABCB6 de humanos) y tampoco se sabe de qué manera el hemo B sintetizado se exporta hacia otras localizaciones. En *S. cerevisiae* se han identificado 3 transportadores tipo ABC mitocondriales, Atm1 es el ortólogo de ABCB7, y Mdl1 y Mdl2 tienen alta homología con ABCB10; todos actúan como exportadores (Jungwirth

y Kuchler, 2006). En particular, se propone que el sustrato de Atm1 es un precursor de la biosíntesis de centros Fe-S, aunque el mismo no ha sido identificado con certeza a pesar de la función esencial de esta proteína en numerosos procesos fisiológicos (Leighton y Schatz, 1995; Kispal y col., 1999). Por otro lado, su función puede ser complementada en células de levadura *atm1Δ* tanto con ABCB7 como con (de manera parcial) ABCB6 de humano, cuyo sustrato y dirección de transporte es marcadamente distinto (Csere y col., 1998; Mitsunashi y col., 2000). Esto plantea la posibilidad que Atm1 también participe del metabolismo de hemo, por lo que los transportadores mencionados, todos de localización mitocondrial, tendrían funciones redundantes. Entonces es posible que la función de Atm1 sea complementada por un importador mitocondrial de hemo, en este caso, mtTcAbcB. La sobreexpresión de Mdl1, la cual tendría un rol en la exportación de péptidos posiblemente unidos a centros Fe-S, también permite restaurar parcialmente la ausencia de Atm1 en *S. cerevisiae*. Por ello, es de esperar que posea funciones de transporte de hemo o compuestos relacionados superpuestas con las de Atm1 y por ende con las de ABCB6 (Chloupková y col., 2003). Sin embargo, células *mdl1Δ* no poseen un fenotipo distinguishable (Dean y col., 1994). La función de Mdl2, que presenta alta homología a Mdl1 y a Atm1, aún no ha sido asignada, pero la deficiencia de esta proteína impide a la célula crecer en glicerol (fuente de carbono no fermentable), un fenotipo que si puede reconocerse fácilmente (Young y col., 2001).

Es importante mencionar que, durante el transcurso de este trabajo de Tesis, se publicaron 2 trabajos referidos a homólogos de mtTcAbcB presentes en *L. major* (Martínez-García y col., 2016) y en *T. brucei* (Horáková y col., 2015). En estas investigaciones se utilizaron estrategias similares a las planteadas por nosotros para el estudio de mtTcAbcB y que discutiremos a lo largo de los resultados presentados en este capítulo. En este contexto, como parte de los objetivos de esta Tesis doctoral nos propusimos estudiar la proteína codificada por el gen *mtTcABCB* de *T. cruzi*, denominado así por su homología con la proteína de mamíferos ABCB6 involucrada en el transporte mitocondrial de porfirinas y para ello realizamos las aproximaciones experimentales que se detallan a continuación.

V.1.1. Caracterización de un posible transportador de hemo en *Trypanosoma cruzi*.

Resultados previos obtenidos en el laboratorio.

Con el fin de avanzar en el conocimiento del transporte mitocondrial de hemo, en el laboratorio realizamos una búsqueda en la secuencia genómica de tripanosomátidos, de secuencias génicas que codifiquen por probables proteínas con homología de secuencia a proteínas transportadoras de hemo ya caracterizadas en células de mamíferos y en organismos procariotas. En *T. cruzi* (cepa CL Brener, El-Sayed y col., 2005) se identificó un marco abierto de lectura de 2208 pb que codificaría para una proteína de 735 residuos aminoácidos (lo que corresponde a una masa molecular de 82 kDa) con homología de secuencia a *AbcB6*. El código de identificación de este posible gen es TcCLB.511021.70. A través del uso de diversos programas de análisis bioinformáticos de libre acceso, hemos determinado que la secuencia génica contendría una secuencia líder de direccionamiento mitocondrial en su extremo N-terminal, y presentaría conservadas las secuencias típicas de los transportadores tipo ABC. Éstas incluyen la región de dominios transmembrana (TMD) y los dominios de unión a nucleótidos (NBD) en la región C-terminal (Locher, 2016) (Figuras 13 y 14). También se identificó la presencia de una secuencia consenso de respuesta a hemo (HRM, por Heme Regulatory Motif), el motivo CPX (Cys-Pro-X) localizado en el N-terminal (residuos 82 a 84) al cual el hemo se uniría en su función como molécula regulatoria (Mense y Zhang, 2006, Furuyama y col., 2007). La estructura descrita corresponde a la de medio transportador de tipo ABC, por lo que es de esperar que se asocie en dímeros. La simulación de la estructura tridimensional de mtTcAbcB resultó en un plegamiento típico de proteína ABC con los segmentos TMD en α -hélice y los dominios NBD globulares ya mencionados (Figura 14).

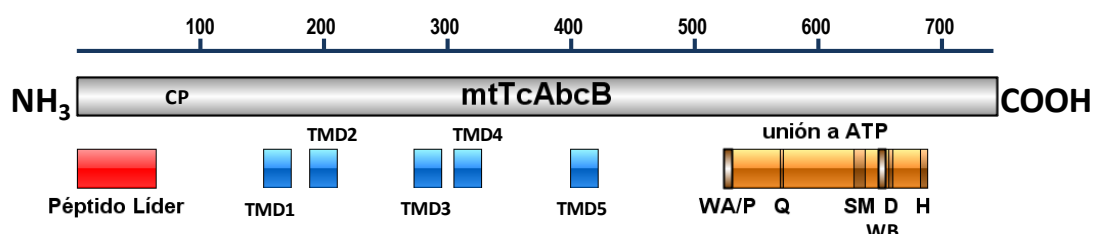
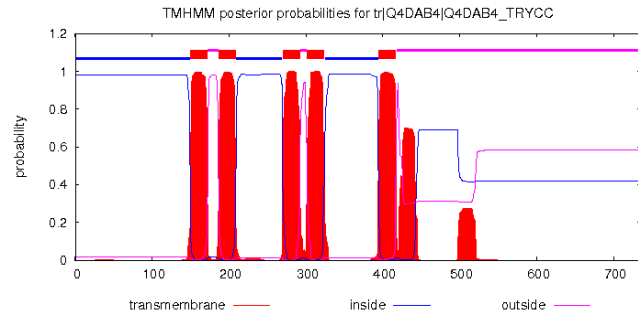


Figura 13. Representación de las estructuras primaria y secundaria de mtTcAbcB de 735 residuos aminoácidos. Se muestra en detalle la extensión del péptido líder N-terminal (posiciones 1-64), la ubicación del motivo CP (82 a 84), las regiones transmembrana TMD1 a TMD5 (150-172, 187-209, 270- 292, 302-324 y 395-417) y la región de unión a nucleótido en el C-terminal (520 a 678) con sus motivos típicos. WA/P= Walker A/P-loop, Q= Q loop/lid, SM = ABC transporter signature motif, WB = Walker B, D = D-loop, H= H-loop/Switch region.

(a)

| Programa | P(mitoc) | Sitio de corte |
|----------|----------|----------------|
| SignalP | NO | - |
| Predotar | 0.74 | |
| TargetP | 0.859 | |
| Mitoprot | 0.9970 | 64 |
| iPSORT | Si* | - |



(b)

```

1  MRRVASSMGGTLQWRWGSRVSWKRQVLIASLTALSEYHLRSISALSPSLWTCRRRLFHQATR
61  LRLEPSKGVSAEAGTNTFRTECPQGKTKEERRKTQKQQQPRRQETAVKEIQPTEDSIVS
121 AEALSKIPVYRVVSHVMRHLWPPGQPMYRVLVVTSVICVVTAKVLKVAVPFWFKMVDAL
181 APDHNVANAVVVLGPLQLGVFGMVAAYGITRLTGSLTEELKSALFAPVGSASTTIAMEM
241 FRKLHSLDLNFHLSRETGVISKDLDRGSRAFWSLAYALLFLVIPTAFVMLVCTALQTS
301 GLSFIVTALS AVFSYIGWTYIVSNWHAVYRERYNKGDSRVGGTLVDSSLNYETVKYFGRE
361 KHEERLFHETIKTNRELARIDQTSVNLFGQQSIFVLAALMCLYLSTCGVVAGAMTVGD
421 MVLVDALLMQLYTPLSFLGMIYREIQTSTQNMQAMIVLLDIESAVREKPDARPLKLGSGT
481 IELRDVCFHFKNKSEGGKVLHRLSLTIPGGSTVAFVGPSSGSGKSTIFRLLYRFYDPSSGL
541 ILIDGQPLTDQLSSVRKAIGVIPQDVTFLFNETVRYNIRYGRLDATDEEV EEAARMANIH
601 DSIMSMSQQYETPVGERGLKLSGGGEKQRIAIARVILDDPPILLADEATSALDSATEIRVM
661 QQLRERGGKRRTIILIAHRLTTVKDADKIFVLDGKGGGLAESGTHEELLGKCGLYAELWFR
721 QLHAAGPGEEEEEL

```

(c)

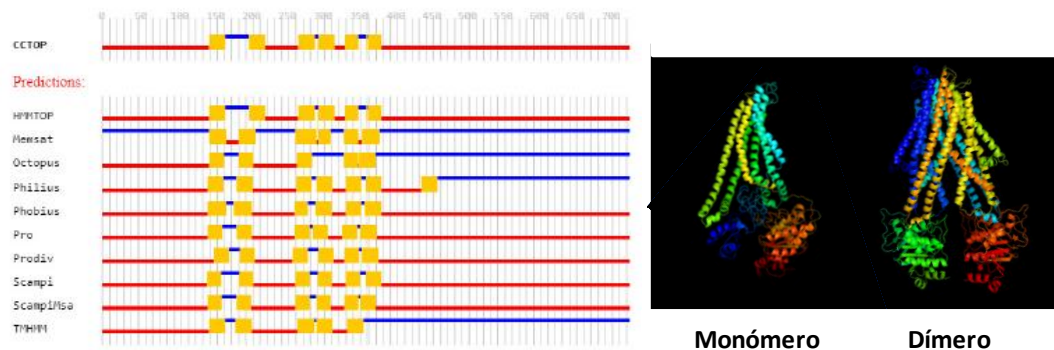


Figura 14.(a) Predicción de direccionamiento a la mitocondria y de segmentos transmembrana utilizando diferentes programas de computadora. La mayoría de los algoritmos utilizados indican una alta probabilidad de direccionamiento a la mitocondria de mtTcAbcB. *La predicción de iPSORT no arroja una probabilidad sino un destino probable, en este caso la mitocondria. Según el programa TMHMM la secuencia proteica de mtTcAbcB posee 5 dominios transmembrana y la probabilidad que el N-terminal se encuentre hacia el interior (citocitol) es del 0.98205, quedando el C-terminal del lado opuesto (el eje X corresponde a la numeración de los aminoácidos en la secuencia proteica). **(b) Secuencia proteica de mtTcAbcB (CL Brener) en formato FASTA.** Se indica en color rojo la secuencia del posible péptido señal, en color celeste los segmentos TMD y en naranja la región C-terminal soluble donde se encuentra el sitio de unión a ATP (subrayado). **(c)** Izquierda: la mayoría de los algoritmos que utiliza CCTOP también predicen un N-terminal hacia el "interior" (citoplasmático, color rojo) Derecha: Representación de la estructura terciaria de mtTcAbcB en disposición de monómero (izquierda) y dímero (derecha) utilizando el programa PyMOL.

Se encontró además que presenta alta homología con las proteínas de humanos ABCB6 y ABCB7 ya descritas, mostrando similitud de más de 55% e identidad de 36% (sección IV.1.1 y IV.1.2). Por esta razón denominamos a la proteína de *T. cruzi*: mtTcAbcB. Cabe mencionar que ABCB6 y ABCB7 no presentan el motivo CPX de unión a hemo. Un alineamiento de la proteína de *T. cruzi* con ABCB6 de humanos se muestra en la Figura 15. Teniendo en consideración lo expuesto anteriormente, es posible postular que mtTcAbcB actúe como un transportador mitocondrial de hemo del parásito. Durante este capítulo se describen los experimentos realizados para tratar de demostrar esta hipótesis.

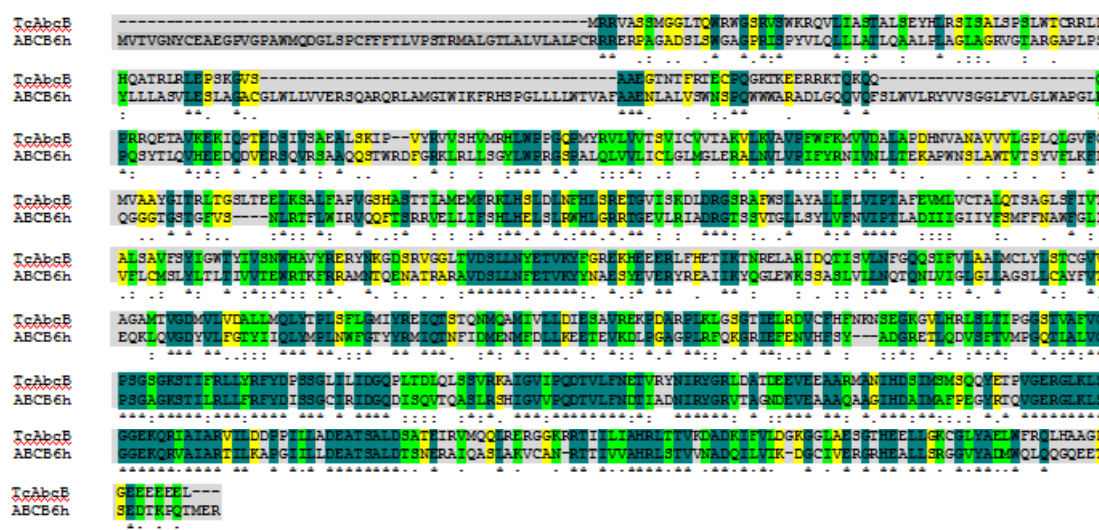


Figura 15. Apilamiento de secuencias proteicas de mtTcAbcB y ABCB6 de humanos mostrando regiones conservadas de identidad (verde) y similitud (amarillo).

En el laboratorio contábamos con ADN genómico purificado de epimastigotes de la cepa Dm28c de *T. cruzi*, que fue utilizado para amplificar y clonar el gen *TCDM_02655* (homólogo a *TcCLB.511021.70* de CL Brener) en el vector pGEM-T Easy. Desde aquí el gen *TCDM_02655* se denominará *mtTcABCB*. En la Figura 16 se muestran las diferencias puntuales en los residuos aminoacídicos de ambas secuencias de tripanosomátidos, estas son, la secuencia reportada para CL-Brener (obtenida de base de datos TriTryp) y la obtenida experimentalmente a partir de ADN genómico purificado de la cepa Dm28c, que coincidió con la secuencia genómica reportada luego para Dm28c. Las mismas presentaron una identidad de 98%, por ello se decidió continuar con la secuencia amplificada para estudiar el rol de la proteína mtTcAbcB.

| | | |
|--------------|-----|--|
| TcAbcB_CLBre | 1 | MRRVASSMGGTLQWRGSRVSWKQVLIASALSEYHLRSISALSPSLWTCRRLFHQATRLRLLEPSKGVSAEAGTNTFRTECPQGKTEERRKTKQKQQP |
| TcAbcB_Dm28c | 1 |F.....L.....T.....K.....N..... |
| TcAbcB_CLBre | 101 | RRQETAVKEKIQPTEDSIVSAEALSKIIPYRVVSVHMRHLWPPGQPMYRVLVVISVICVVIKVLKVAVPWFQMVVDALAPDHNVANAVVLGPLQLGV |
| TcAbcB_Dm28c | 101 |E.....E.....V.....K..... |
| TcAbcB_CLBre | 201 | FGMVAAYGITRLTGSLTEELKSALFAPVGSASHSTI IAMEMFRKLHSLDLNFHLSRETGVISKDLDRGSRAFWSLAYALLFLVIPTAFVMLVCTALQTS |
| TcAbcB_Dm28c | 201 |V..... |
| TcAbcB_CLBre | 301 | GLSFIVTALS AVFSYIGWTYIVSNHNAVYRERYNKGD SRVGGTLVD SLLNYETVKYFGREKHEEERLFHETIKTNRELARIDQITISLVNFGQSSIFVLAA |
| TcAbcB_Dm28c | 301 | |
| TcAbcB_CLBre | 401 | LMCLYLSTCGVVAGAMTVGDMVLVDALLMQLYIPLSFLGMIYREIQTSTQNMQAMIVLLDIESAVREKPDARPLKLGSGTIELRDVCFHFNKNSEKGV |
| TcAbcB_Dm28c | 401 | |
| TcAbcB_CLBre | 501 | HRLSLTI PGGSTVAFVGPSSGSGKSTIFRLLYRFYDPSSGLILIDGOPLTDLQLSSVRKAIGVIPQDITVLFNETVRYNIRYGRLDATDEEVEEAARMANIH |
| TcAbcB_Dm28c | 501 |R..... |
| TcAbcB_CLBre | 601 | DSIMMSQQYETPVGERGLKLSGGEKQRIAIARVILDDPPIILLADEATSALDSATEIRVMQQLRERGGKRRITIIILIAHRLTTVKDADKIFVLDGKGLAE |
| TcAbcB_Dm28c | 601 | |
| TcAbcB_CLBre | 701 | SGTHEELLGKCGLYAELWFRQLHAAGPGESEEEEL |
| TcAbcB_Dm28c | 701 | |

Figura 16. Apilamiento de las secuencias proteicas del transportador mtTcAbcB de *Trypanosoma cruzi* cepas CL-Brener y Dm28c. Las coincidencias entre ambas secuencias se indican con puntos, mientras que las diferencias se indican especificando la identidad de cada aminoácido.

A la secuencia de *mtTcABCB* clonada se le incorporó una secuencia 3' que codifica para una cola de 6 histidinas (*HIS*) o una secuencia c-Myc (*c-MYC*), ambas en la posición C-terminal de la proteína. La correcta amplificación fue confirmada mediante la resolución de las secuencias recombinantes. Luego, el gen recombinante fue clonado en vectores de expresión para levaduras (pRS426M25) y, para *T. cruzi* (pTrex-n; Vazquez y Levin, 1999). La región codificante del dominio C-terminal de la proteína mtTcAbcB se clonó en un vector de expresión en *E. coli*, a partir del cual posteriormente se expresó y purificó dicho dominio para ser utilizado como determinante antigénica en la obtención de anticuerpos policlonales específicos anti-mtTcAbcB de conejo en el servicio de bioterio de nuestra facultad (FCByF-UNR) (sección IV.6.4).

Como primera aproximación para la caracterización funcional de mtTcAbcB se llevaron a cabo estudios preliminares de complementación en células de *S. cerevisiae atm1Δ* (generosamente donadas por el Dr. Roland Lill, Alemania). Los resultados obtenidos a partir de la expresión del gen de *T. cruzi* en estas células *knock out* de *ATM1* (*atm1Δ*) mostraron una supresión parcial del fenotipo mutante de crecimiento producido por la delección mencionada (células que crecen débilmente en medio rico e incapaces de crecer en medios con fuentes de carbono no-fermentables), Figura 17. La expresión del gen *mtTcABCB* sería suficiente para compensar parcialmente la ausencia de *Atm1* respecto al crecimiento en medio rico y, si bien es preliminar, permitió suponer que el gen *mtTcABCB* era expresado en levaduras y que la proteína, al menos en parte, se localizaba en la mitocondria y podía compensar funcionalmente la pérdida

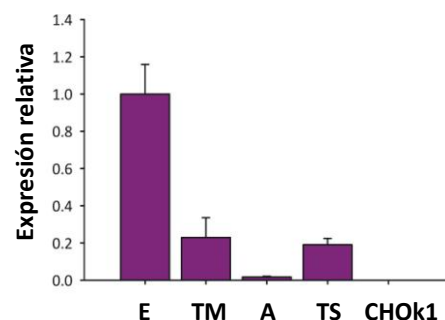
de Atm1. Por ello no se descarta su posible función como transportador de hemo (y/o porfirinas) (Mitsuhashi y col., 2000).



Figura 17. Expresión de *mtTcABCB.HIS* en *Saccharomyces cerevisiae atm1Δ*. Se observa la recuperación parcial del crecimiento por estriado en medio YPD de células de *S. cerevisiae atm1Δ* complementadas con *mtTcABCB* respecto a la misma cepa de células sin complementar y células de cepa silvestre (WT).

Por otro lado, tomando como referencia el estudio realizado en *Leishmania* por Leprohon y colaboradores (Leprohon y col., 2006), se analizó el patrón de expresión de *mtTcABCB* cuantificando la acumulación de ARNm de este gen a lo largo del ciclo de vida de *T. cruzi*. Los ensayos de qRT-PCR (PCR cuantitativa en tiempo real) se realizaron en colaboración con el laboratorio del Dr. Ariel Silber de la Universidad de San Pablo (Brasil), donde se utilizaron muestras de los diferentes estadios de la cepa CL14 de *T. cruzi*. Un análisis preliminar de los resultados obtenidos mostró que este gen presenta una expresión diferencial en los distintos estadios del ciclo de vida del parásito (Figura 18), correspondiendo a la forma de epimastigote el máximo nivel (Menendez Bravo, 2011). Sin embargo, estos resultados difieren con los reportados a partir de ensayos de microarreglo del mismo gen sobre el transcriptoma de *T. cruzi* que se encuentran publicados (Minning y col., 2009) y disponibles en la base de datos TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/app/record/gene/TcCLB.511021.70#ExpressionGraphs>). En el segundo caso los datos se obtuvieron a partir de una cepa de referencia diferente (*Trypanosoma cruzi* Brazil), detectándose mayores niveles de transcripto en ambas formas replicativas, con el estadio de amastigote superando al de epimastigote.

Figura 18. Análisis de las cantidades relativas de ARNm de *mtTcABCB* en los distintos estadios de vida de *Trypanosoma cruzi*. Se observa que *mtTcABCB* se expresa de manera diferencial. E, epimastigote; TM, tripomastigote metacíclico, A, amastigote, TS, tripomastigote sanguíneo, CHOK1, control realizado con células CHO no infectadas.



Por último, se analizó el efecto de la expresión del gen recombinante *mtTcABCB.c-MYC* sobre el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* que fueron previamente transfectados con el vector pTrex-n conteniendo el gen en estudio. Las curvas de crecimiento realizadas no mostraron diferencias fenotípicas significativas

entre los epimastigotes transfectantes y los de tipo salvaje. Estos resultados permiten descartar un posible efecto deletéreo debido a la presencia de la proteína recombinante mtTcAbcB.c-Myc.

V.1.2 Resultados

V.1.2.1 Obtención de herramientas moleculares para el estudio de mtTcAbcB

Para el estudio de función de mtTcAbcB se generó una nueva versión recombinante con fusión a GFP en C-terminal, a partir de la secuencia para mtTcAbcB.His ya presente en el laboratorio. Esta versión permitirá detectar el posible transportador de hemo mitocondrial de *T. cruzi* tanto en ensayos de microscopía como en Western blot en levaduras y en el parásito.

V.1.2.1.1 Construcción de la secuencia recombinante *mtTcABCB.HIS-GFP*

En primer lugar, se construyó la secuencia recombinante que codifica para la proteína de fusión mtTcAbcB.His-GFP (denominación del gen recombinante *mtTcABCB.HIS-GFP*). Si bien contábamos con la secuencia recombinante *mtTcABCB.c-MYC*, los ensayos de Western blot realizados mostraban señales inespecíficas, lo que dificultaba su análisis. Por ello, se decidió seguir la fase de clonado utilizando el gen recombinante que contenía la etiqueta de 6 histidinas, *mtTcABCB.HIS*. En un primer paso se amplificó mediante PCR (sección IV.5.3.1) el gen codificante de mtTcAbcB.His a partir de la secuencia clonada en pGEM-T Easy (Tabla I, sección IV.2.1). Se utilizaron los oligonucleótidos FPTcABCB-2 y RevHis-noStop2 (Tabla II, sección IV.2.2) que permitieron amplificar el fragmento de interés reemplazando el codón *stop* en 3' por el codón codificante de glicina, manteniendo la secuencia de cola de His y el sitio de reconocimiento para la enzima *Xho* I, mientras que en 5' se reemplazó el sitio *Hind* III por el de *Bam*H I. La secuencia resultante, de 2246 pb, se denominó *mtTcABCB.HISnonstop*. El producto de PCR fue separado por electroforesis en gel de agarosa al 1%, se verificó que presentara el tamaño esperado, y luego fue purificado según se detalla en Materiales y Métodos (secciones IV.5.4 y IV.5.5). En la Figura 19 se muestra a modo de ejemplo uno de los geles obtenidos.

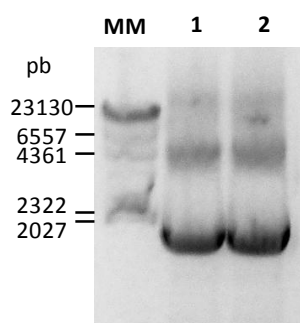


Figura 19. Gel de agarosa al 1% p/v mostrando la amplificación del fragmento *mtTcABCB.HISnonstop* de 2246 pb obtenido por PCR.

El fragmento que contiene la secuencia *mtTcABCB.HISnonstop* fue posteriormente clonado en el vector pENTR3C (Invitrogen) a través de los sitios de restricción *Bam*H I y *Xho* I. Para ello el inserto y el vector fueron tratados con *Bam*H I y *Xho* I y los productos de restricción separados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1%. Las bandas de interés fueron purificadas utilizando el kit comercial Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega) y posteriormente sometidas a reacción de ligación utilizando la enzima T4 ligasa (Fermentas) (secciones IV.5.6, IV.5.4, IV.5.5 y IV.5.7). Dado que el inserto y el vector tenían un tamaño similar (2232 y 2269 pb, respectivamente) se utilizó una relación molar 1:1 de los mismos en la reacción de ligación. También se realizó como control de religación la misma reacción en ausencia de inserto. El producto de estas reacciones fue utilizado para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α por método químico, que luego fueron sembradas en medio LB sólido conteniendo 50 μ g/ml de Kan como agente de selección (sección IV.5.8). La verificación de la correcta inserción del inserto en el vector se realizó mediante reacciones de PCR de colonia utilizando los cebadores FPTcABCB-2 y RevHis-noStop2. Se analizaron 10 colonias de la placa correspondiente al producto de reacción de ligación y 1 del control de ligación seleccionadas al azar (sección IV.5.9). Como se observa en la Figura 20, sólo 3 de las colonias seleccionadas dieron resultado positivo, las #5, #9 y #10.

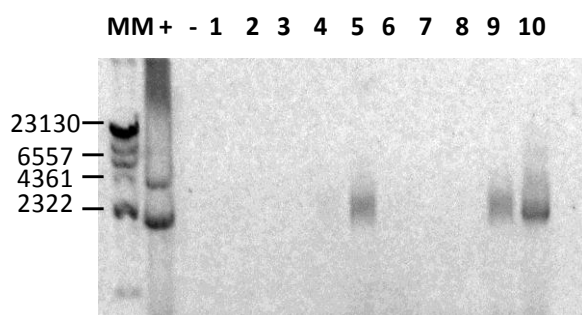


Figura 20. Gel de agarosa al 1 % p/v mostrando los productos de amplificación de la PCR de colonia realizada sobre células de *E. coli* DH5 α transformadas con las mezclas de ligación pENTR3C - inserto (*mtTcABCB.HISnonstop*). MM, marcador molecular; +, control positivo; -, control negativo; 1 a 10, colonias transformadas con la mezcla inserto-vector.

Para confirmar el proceso de clonado, las 3 colonias positivas fueron incubadas en medio líquido selectivo O.N. (LB suplementado con Kan 50 µg/ml) con agitación y a 37 °C, y se procedió a la extracción del ADN plasmídico de estos clones utilizando un *kit* comercial (sección IV.5.1). El ADN plasmídico obtenido fue sometido a digestión con las enzimas *Bam*H I y *Kpn* I como método rápido de verificación de la presencia del inserto en el vector recombinante. Utilizar *Kpn* I en lugar de *Xho* I permitió obtener fragmentos de digestión de tamaño distinguible uno de otro (1444 y 3054 pb); los patrones de digestión fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Por último, la introducción de los cambios deseados en la secuencia de *mtTcABCB.HISnonstop* se confirmó en los 3 clones mediante secuenciación de ADN a partir de los sitios *ext-attL1* y *ext-attL2* que flanquean el sitio de múltiple clonado del vector pENTR3C (sección IV.5.10). Entonces, los respectivos clones de células fueron almacenados a -80 °C según se indica en el apartado IV.4.4 y los plásmidos correspondientes, pENTR3C.*mtTcABCB.HISnonstop*, además se almacenaron a -20 °C (sección IV.5). En general, salvo que se indique alguna diferencia, para todos los clonados realizados en este trabajo de Tesis se siguió la misma secuencia de pasos y todos los clones obtenidos fueron almacenados a -80 °C (células transformadas) y -20 °C (plásmidos).

Para continuar con la construcción del gen recombinante que exprese la proteína de fusión *mtTcAbcB.His-GFP*, también se amplificó por PCR (sección IV.5.3.2) la secuencia codificante de la proteína GFP a partir del vector pTcGFPN (disponible en el laboratorio, Tabla I en sección IV.2.1) con los cebadores FPpTcGFPN-3 y RPpTcGFPN-5 (Tabla II, sección IV.2.2), que introdujeron sitios de reconocimiento para *Xho* I en 5' y *Sal* I - *EcoR* V - *Xba* I en 3' de la secuencia amplificada (*GFP*). El producto de 747 pb fue posteriormente clonado, siguiendo los pasos ya descritos, en el pENTR3C.*mtTcABCB.HISnonstop* en 3' y en fase con el primer inserto a través de los sitios de reconocimiento para *Xho* I y *EcoR* V. Se eligió esta última enzima en lugar de *Xba* I dado que la secuencia del transportador mitocondrial posee un sitio *Xba* I interno en la posición 1746 (pb). El producto de la reacción de ligación fue utilizado para transformar células de *E. coli* DH5α por método químico que luego fueron seleccionadas en medio sólido LB suplementado con Kan 50 µg/ml (sección IV, apartados 5.4 a 5.8). Para verificar el correcto clonado, se analizaron por PCR de colonia 22 colonias seleccionadas al azar utilizando los oligonucleótidos FPpTcGFPN-3 y

RPpTcGFPN-5 (sección IV.5.9). Todas las colonias ensayadas resultaron positivas y de estas se seleccionaron 6 (las colonias #7, #8, #9, #14, #15 y #16), para verificar la construcción *mtTcABCB.HIS-GFP* en pENTR3C mediante patrón de restricción. Para ello se les extrajo el ADN plasmídico, el cual posteriormente se sometió a digestión con enzimas *BamH* I y *EcoR* V. Los productos de la digestión obtenidos, mostraron el patrón de tamaños esperado, como se muestra en la Figura 21 (apartados 5.1, 5.6 y 5.4 de Materiales y Métodos). Los clones #8, #9 y #14 se corroboraron por secuenciación del inserto a partir de los sitios *ext-attL1* y *ext-attL2* del vector y además se utilizó el cebador FSeqTcABCB6-1 (Tabla II) que hibrida en una región interna de *mtTcABCB* y permite leer por sobre el empalme *HIS-GFP* (sección IV.5.10). Los resultados mostraron que los 3 clones elegidos presentaron la secuencia esperada para el gen recombinante *mtTcABCB.HIS-GFP*. Entonces, tanto las células transformantes como sus plásmidos, fueron almacenados de la manera habitual (secciones IV.4.4 y IV.5).

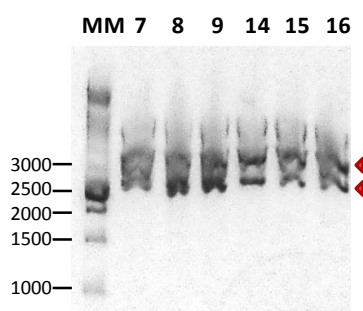


Figura 21. Productos de digestión de 2963 pb (inserto *mtTcABCB.HIS-GFP*) y 2262 pb (vector pENTR3C), con enzimas *BamH* I y *EcoR* V obtenidos a partir del ADN plasmídico de los clones #7, #8, #9, #14, #15 y #16 portando el pENTR3C.*mtTcABCB.HIS-GFP*.

V.1.2.1.2 Clonado de las secuencias recombinantes *mtTcABCB.HIS* y *mtTcABCB.HIS-GFP* en vectores de expresión disponibles.

Los sitios *BamH* I y *Sal* I - *EcoR* V introducidos en los extremos 5' y 3' de la secuencia fusión *mtTcABCB.HIS-GFP* permitieron su posterior clonado en vectores de expresión. Para realizar los ensayos en levaduras, el gen recombinante fue clonado en pRS426M25 entre los sitios de restricción para *BamH* I y *Sal* I (Tabla I y Figura 12 de sección IV.2.1). Brevemente, el vector de partida (pENTR3C.*mtTcABCB.HIS-GFP*) y el de destino fueron digeridos con estas enzimas, y los fragmentos de interés se incubaron en condiciones de ligación (relación 1:3 de inserto:vector) (apartados 5.6, 5.4 y 5.5 de Materiales y Métodos). Con el producto resultante se transformaron células de *E. coli* DH5α que fueron seleccionadas en medio sólido con Amp 150 µg/ml (secciones IV.5.7

y IV.5.8). De las colonias obtenidas, 9 se analizaron por PCR de colonia resultando 7 positivas (las #1, #2, #3, #6, #7, #8 y #9); a todas ellas se les extrajo el ADN plasmídico que luego se verificó por patrón de restricción revelando la presencia del inserto del tamaño esperado. Luego, 2 de ellas fueron resueltas por secuenciación. Finalmente, los clones #1 y #2 portando el vector pRS426M25.*mtTcABCB.HIS-GFP* fueron almacenados de la forma usual (sección IV apartados 5.9, 5.1, 5.6, 5.4, 5.10, 4.4 y 5).

Por otro lado, el gen recombinante *mtTcABCB.HIS* ya se encontraba presente en el laboratorio clonado en el vector pRS426M25 entre los sitios *BamH I* y *Xho I* (sección IV.2.1, Tabla I). A partir de este vector, mediante digestión con *BamH I* y *Xho I*, se clonó el gen en el vector pENTR3C escindido con las mismas enzimas, obteniéndose el plásmido que denominamos pENTR3C.*mtTcABCB.HIS* (sección IV.5.6, IV.5.4, IV.5.5 y IV.5.7). Con este producto de ligación se transformaron células de DH5α competentes, que fueron seleccionadas en medio LB sólido con Kan 50 µg/ml (apartado IV.5.8). De las numerosas colonias transformantes obtenidas, se seleccionaron 18 que se analizaron por PCR de colonia, resultando 8 positivas (las #2, #5, #7, #8, #10 #13, #14 y #15). A estas se les extrajo el ADN plasmídico (pENTR3C.*mtTcABCB.HIS*), cuya correcta construcción se verificó por digestión enzimática con las enzimas *BamH I* y *Kpn I*. A excepción de los clones #2 y #14, los 6 restantes mostraron el patrón de digestión esperado, entonces los respectivos clones de células y plásmidos fueron almacenados en stock (apartados 5.9, 5.1, 5.6, 5.4, 4.4 y 5 de sección IV).

Para estudiar la expresión de ambos genes recombinantes en epimastigotes de *T. cruzi*, estos fueron clonados en el vector de expresión pTcINDEX disponible en el laboratorio (sección IV.2.1, Tabla I). Para ello los vectores pENTR3C.*mtTcABCB.HIS* y pENTR3C.*mtTcABCB.HIS-GFP* fueron digeridos con las enzimas *BamH I* y *EcoR V*, y el vector pTcINDEX con *BamH I* y *Nru I* (que al igual que *EcoR V* genera extremos romos en el ADN). Subsiguientemente se ligaron los fragmentos de interés (*mtTcABCB.HIS* o *mtTcABCB.HIS-GFP* y pTcINDEX) y con la mezcla de reacción se transformaron células de *E. coli* DH5α competentes (apartados 5.6, 5.4, 5.5, 5.7 y 5.8 de sección IV). Las células transformantes se seleccionaron por su resistencia a Amp 150 µg/ml y de las colonias obtenidas, se eligieron 15 de cada transformación para verificar el clonado mediante selección en diferentes antibióticos. Así, las colonias fueron repicadas en medio LB sólido con Clm, Kan o Amp (30, 50 y 150 µg/ml, respectivamente). Si el

clonado fuese correcto, las células serían resistentes sólo a Amp; todas las colonias ensayadas crecieron en la condición permisiva (Amp) y no lo hicieron en las condiciones restrictivas (Cln y Kan). Posteriormente, a 3 clones de cada evento de transformación se les extrajo el ADN plasmídico y la presencia del inserto se verificó rápidamente por patrón de digestión y posterior secuenciación (oligos FP_HX1 y RP_Ig.Act) (secciones IV.5.1, IV.5.6, IV.5.4 y IV.5.10). Por último, los clones pTcINDEX.mtTcABCB.HIS #1, #2 y #3 y pTcINDEX.mtTcABCB.HIS-GFP #1, #2 y #3 se almacenaron de la manera habitual (sección IV.4.4 y IV.5).

La estrategia utilizada para llevar a cabo los clonados que se mencionan en el presente apartado se esquematizan en la Figura 22.

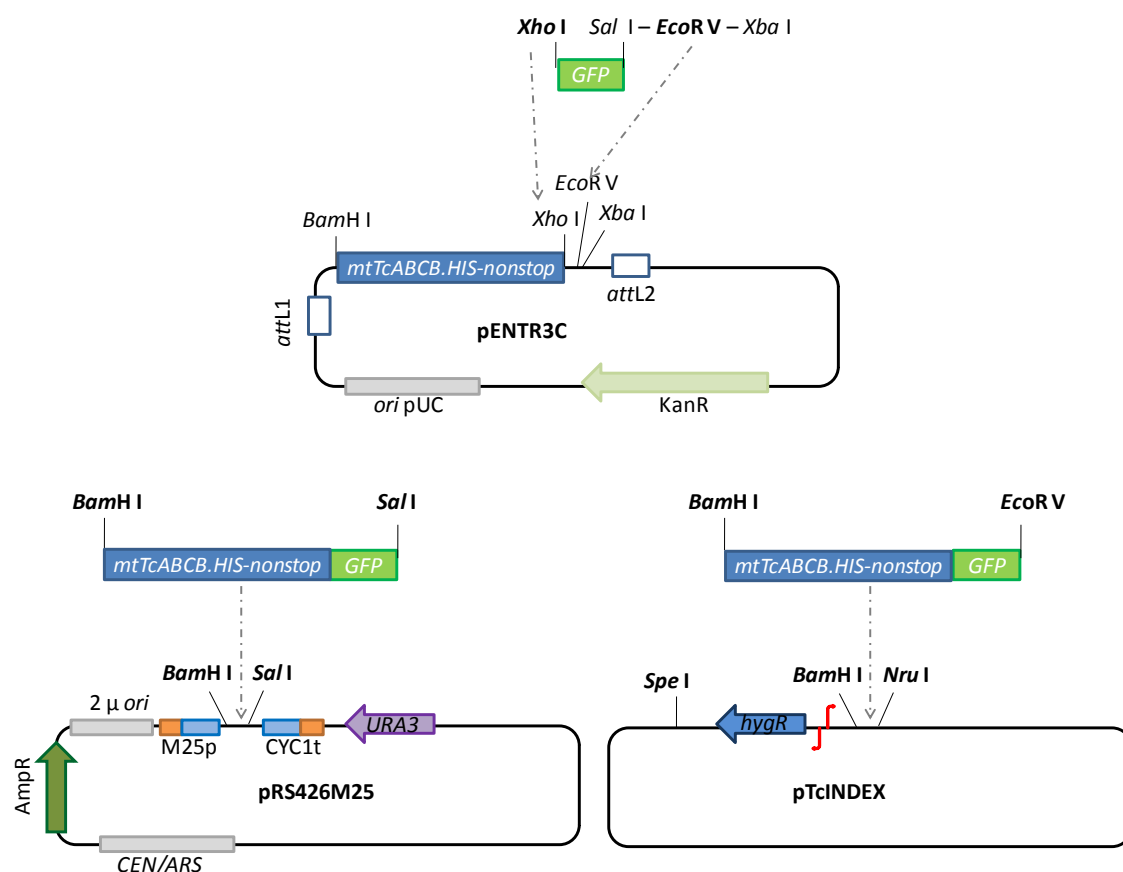


Figura 22. Estrategia de clonado para *mtTcABCB.HIS-GFP*. En la parte superior, se muestra la estrategia de generación de la secuencia *mtTcABCB.HIS-GFP* en el vector pENTR3C y su posterior clonado a los vectores pRS426M25 para su expresión en levaduras y pTcINDEX para su expresión en *T. cruzi*.

V.1.2.1.3 Construcción del vector de expresión pRS414M25

Con el fin de evaluar el efecto de la expresión en la misma célula de los genes recombinantes de las proteínas mtTcAbcB y TcHTE (Merli y Pagura y col., 2016;

clonada también en el vector pRS426M25), se decidió clonar las secuencias *mtTcABCB.HIS* y *mtTcABCB.HIS-GFP* en un vector de expresión en levaduras que tuviese otro marcador de selección. Además, éste nos proporcionaría mayor versatilidad para ensayar el estudio de función de los genes de interés al posibilitar su expresión en células de levadura de otros genotipos. El vector elegido fue el pRS414 (Tabla I, sección IV.2.1), generosamente donado por el laboratorio de Dennis Winge (Utah), que confiere capacidad de síntesis de Trp (Mumberg y col., 2014). Entonces, la transformación de células de *S. cerevisiae* auxótrofas para Trp y para Ura con los plásmidos pRS414 y pRS426 podrá seleccionarse en un medio que carezca de ambos aminoácidos.

El vector pRS414 no presenta secuencia promotora ni terminadora de la transcripción. Por ello, en primer lugar decidimos clonar en pRS414 los genes de *mtTcABCB.HIS(-GFP)* junto con las secuencias del promotor *MET25* y el terminador *CYC1* adyacentes a través de la digestión con las enzimas *Sac* I y *Kpn* I que flanquean toda la construcción en pRS426M25. Dado que el gen de *mtTcABCB* posee un sitio *Kpn* I interno, se procedió a hacer una digestión controlada de los plásmidos pRS426M25.*mtTcABCB.HIS* y pRS426M25.*mtTcABCB.HIS-GFP* con dicha enzima. Luego de numerosos intentos, en los cuales la enzima digirió por completo los plásmidos, se planteó una nueva estrategia. Así, optamos por primero construir el vector pRS414M25 donde el casete *MET25-CYC1* presente en el pRS426M25 (Tabla I, sección IV.2.1) fuera clonado entre los sitios *Sac* I y *Kpn* I de pRS414 y, posteriormente, clonar los genes de interés, siguiendo la misma estrategia que la realizada para la construcción de los vectores pRS426M25.*mtTcABCB.HIS* y pRS426M25.*mtTcABCB.HIS-GFP*.

El vector pRS414 fue digerido con *Sac* I y *Kpn* I generando un vector linealizado de 4686 pb. A su vez, el vector pRS426M25 fue digerido con las mismas enzimas, para liberar el casete promotor *MET25-SMC-CYC1* terminador de 712 pb (secciones IV.5.6, IV.5.4 y IV.5.5). Los productos de las digestiones se incubaron en condiciones de ligación para generar el vector pRS414M25 (apartado 5.7 de sección IV). La mezcla de ligación se utilizó para transformar células de *E. coli* DH5α y las transformantes se seleccionaron por su resistencia a Amp (150 µg/ml) (sección IV.5.8). Luego se eligieron al azar 10 colonias a las que se les extrajo el ADN plasmídico (sección IV.5.1) y la

correcta construcción del vector pRS414M25 se verificó por patrón de restricción. Para ello, los plásmidos fueron tratados con las enzimas *Bam*H I o *Kpn* I generando el plásmido linealizado de 5398 pb, y con las enzimas *Sac* I y *Kpn* I liberando un inserto de 712 pb y el vector de 4686 pb. Adicionalmente, se verificó que revierta la auxotrofía para Trp por transformación de células de *S. cerevisiae* DY5113 y posterior selección en medio SCDO Glu -Trp (sección IV.5.11). Los clones de las colonias #5 y # 8 satisficieron los requisitos anteriores, entonces fueron seleccionados y almacenados (sección IV.4.4 y IV.5).

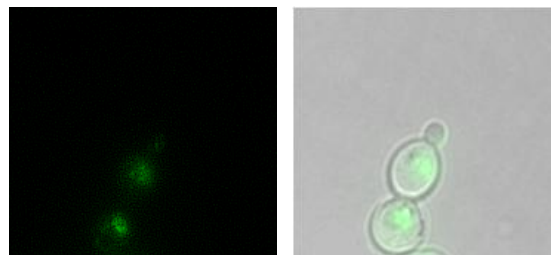
En un segundo paso, se clonaron los genes *mtTcABCB.HIS* y *mtTcABCB.HIS-GFP* en el vector pRS414M25. Para ello se utilizaron las siguientes enzimas:

- *Bam*H I y *Xho* I para escindir el gen recombinante *mtTcABCB.HIS* (en pRS426M25. *mtTcABCB.HIS*) y el vector pRS414M25.
- *Bam*H I y *Sal* I para liberar el gen recombinante *mtTcABCB.HIS-GFP* (en pENTR3C. *mtTcABCB.HIS-GFP*) y escindir el vector pRS414M25.

Los productos de interés (cada inserto con el vector pRS414M25) se incubaron en presencia de enzima Ligasa T4 (Fermentas) y su solución amortiguadora correspondiente. El producto resultante se utilizó para transformar células de *E. coli* DH5α por el método químico (secciones IV.5.6, IV.5.4, IV.5.5, IV.5.7 y IV.5.8). Las colonias fueron seleccionadas por su resistencia a Amp 150 µg/ml. De las células transformantes obtenidas, se seleccionaron al azar 10 de cada reacción de ligación y 2 de cada control de religación a las cuales se les extrajo ADN plasmídico, y la correcta construcción de los vectores se verificó por patrón de restricción (secciones IV.5.6 y IV.5.4). De aquellos clones que mostraron el patrón de digestión esperado se seleccionaron los clones #1, #3 y #4 de pRS414M25.*mtTcABCB.HIS* y los clones #1, #6 y #10 de pRS414M25.*mtTcABCB.HIS-GFP* para su almacenamiento en stock de la manera habitual (sección IV.4.4 y IV.5).

Estos plásmidos junto con el vector pRS414M25 (control) se utilizaron para transformar células de *S. cerevisiae* DY5113, tras lo cual se verificó la reversión de su auxotrofía para Trp en el crecimiento, así como la fluorescencia de la porción GFP de la proteína recombinante mtAbcB.His-GFP por la técnica de microscopía de fluorescencia (Figura 23) (secciones IV.5.11, IV.4.2 y IV.8.1).

Figura 23. Validación de la expresión de mtTcAbcB.His-GFP a partir de pRS414M25 en *Saccharomyces cerevisiae*. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células de *S. cerevisiae* DY5113 transformadas con pRS414M25.mtTcABCB.HIS-GFP crecidas O.N. en medio SCDO Glu, -Trp, Met 10 mg/l.



V.1.2.1.4 Purificación de anticuerpos anti-mtTcAbcB

Para profundizar el estudio de mtTcAbcB nos propusimos contar con anticuerpos policlonales purificados a partir del suero inmune contra el péptido P2(TcAbcB) disponible en el laboratorio. Los mismos constituirán una herramienta para realizar ensayos de Western blot e IFI y confirmar la presencia y acumulación de la proteína, tanto sobre cepas de *T. cruzi* salvaje y transfectantes como las distintas cepas de *S. cerevisiae* que utilizamos para el estudio de mtTcAbcB.

El suero inmune anti-TcAbcB primero se ensayó por la técnica de Western blot sobre extractos proteicos totales obtenidos de epimastigotes de *T. cruzi*, realizando los controles adecuados. Como en estos ensayos se obtuvieron bandas no específicas se decidió seguir un protocolo de purificación para optimizar la especificidad. A tal efecto, los anticuerpos anti-mtTcAbcB se purificaron y concentraron a partir de suero inmune de conejo, según el protocolo de uso habitual en nuestro laboratorio con algunas modificaciones (sección IV.6.4). La capacidad de los mismos de reconocer a mtTcAbcB se verificó mediante ensayos de Western blot de muestras conteniendo el péptido GST-P2(TcAbcB).His purificado, donde P2 corresponde al segmento C-terminal soluble de la proteína que fuera utilizado para la inoculación.

V.1.2.2 Análisis de la expresión de las formas recombinantes de mtTcAbcB en *Saccharomyces cerevisiae*

Por otro lado, para avanzar en la elucidación de la función de mtTcAbcB nos propusimos analizar el fenotipo causado por su expresión en células de *S. cerevisiae* deficientes en los transportadores tipo ABC mitocondriales con posibles funciones en el transporte de porfirinas, y también en células defectuosas en la biosíntesis de hemo. Es así que, las secuencias de *mtTcABCB.HIS* y *mtTcABCB.HIS-GFP* se ensayaron por complementación *in trans* de levaduras *knock out* para los genes codificantes de las proteínas Atm1, Mdl2 y ALAS:

➤ ***atm1Δ***: éstas células presentan un crecimiento muy reducido (*petite*), y sólo son capaces de crecer en fuentes de carbono fermentables, lo que sugiere una pérdida de la capacidad respiratoria. Además, acumulan grandes cantidades de hierro en la mitocondria (30 veces más que una cepa salvaje), cuyas propiedades redox generan EROs. Como consecuencia de este estrés oxidativo, pierden el ADN mitocondrial (fenotipo *rho*⁰) y los citocromos mitocondriales, tienen un elevado nivel de glutatión y niveles reducidos de hemoproteínas citosólicas (Leighton y Schatz, 1995; Kispal y col., 1997). La acumulación de hierro en la matriz también ocasiona una deficiencia de este elemento en el citosol y la pérdida de proteínas ferro-sulfuradas. Este fenotipo revierte totalmente con la expresión de las proteínas ABCB7 de humanos (Csere y col., 1998) y LmABCB3 de *L. major* (Horáková y col., 2015) , mientras que lo hace parcialmente por la expresión de ABCB6 de humanos (Mitsubishi y col., 2000), Mdl1 de *S. cerevisiae* (Chloupková y col., 2003) y de las proteínas *TbAtm* y *TbMdl* de *T. brucei*, que presentan alta homología a Atm1 (Martínez-García y col., 2016).

➤ ***mdl2Δ***: poco se sabe de la función de Mdl2, a excepción que la deficiencia en esta proteína causa defectos en el crecimiento en presencia de glicerol. Dada la posibilidad de poseer alguna función en la respiración, sumado a la alta homología que presenta con Atm1 y Mdl1 se la utiliza en experimentos de complementación con preferencia por sobre cepas *mdl1Δ*, ya que éstas no poseen un fenotipo mutante distintivo (Young y col., 2001). La proteína homóloga *TbMdl* de *T. brucei* permite que estas células recuperen su capacidad de crecer en glicerol en forma parcial (Horáková y col., 2015).

➤ ***hem1Δ***: estas células carecen del gen *HEM1* que codifica para la enzima ALAS responsable de la síntesis del primer intermediario de la vía biosintética de hemo, el δ -ALA, en el interior de la matriz mitocondrial (sección 5.1. de Introducción, Figura 11) (Crisp y col., 2003). En consecuencia, son incapaces de sintetizar hemo B y, por ende, hemo C y hemo A, lo cual conlleva a la incapacidad de realizar la respiración celular. Este fenotipo puede determinarse por evaluación del crecimiento en medios con fuentes de carbono no fermentable (Gli-EtOH). Para compensar dicha deficiencia las levaduras deben incorporar hemo del entorno, o bien, alguno de los intermediarios de la vía de síntesis; normalmente se adiciona δ -ALA o hemina al medio de cultivo. *S. cerevisiae* es altamente deficiente en la utilización de hemo exógeno, de hecho no se

han identificado hasta el momento transportadores de alta afinidad, aunque no se descarta que posea alguno de baja afinidad o poca especificidad que le permita captar el hemo del exterior en condiciones de deficiencia.

V.1.2.2.1 Expresión de mtTcAbcB.His en células *hem1Δ*

Si bien la secuencia de mtTcAbcB contiene una pre-secuencia de localización mitocondrial, se ha reportado que, en células de mamíferos, ABCB6 localiza también en la membrana plasmática (Paterson y col., 2007). Por esto no descartamos que mtTcAbcB pueda también intervenir en la importación de hemo desde el exterior. Entonces, como primera aproximación a la caracterización bioquímica y funcional de mtTcAbcB en el sistema de expresión heterólogo *S. cerevisiae*, evaluamos si su expresión puede alterar la concentración intracelular de hemina, agregada al medio de cultivo para permitir el crecimiento de *S. cerevisiae hem1Δ*. En condiciones estándar, la concentración de hemina necesaria para permitir el desarrollo de células *hem1Δ* debe ser igual o mayor de 1 μM (0,6 $\mu\text{g/ml}$). La presencia de transportadores específicos de hemo en estas levaduras deficientes en la síntesis del cofactor le permitirían crecer en medios de cultivo suplementados con menores concentraciones de hemina. Ensayos similares fueron utilizados para estudiar el rol en el transporte de hemo de las proteínas CeHRG-4 (Yuan y col., 2012), LHR1 (Huynh y col., 2012) y, más recientemente, TcHTE estudiada en nuestro laboratorio demostrándose que localiza en membrana plasmática de levaduras y facilita la incorporación de hemo y análogos de éste (Merli y Pagura y col., 2016).

En primer lugar se transformó la cepa de *S. cerevisiae hem1::LEU2* (sección IV.3.2) con vectores de expresión pRS426M25 conteniendo las secuencias de *mtTcABCB.HIS*, *TcHTE.HIS* o ninguna (control). Las mismas fueron seleccionadas en medio sólido SCDO Glu sin Ura ni Leu (selección del plásmido y la cepa, respectivamente) y conteniendo δ -ALA 250 μM (33 $\mu\text{g/ml}$) (sección IV.5.11 y IV.4.2). Posteriormente, se realizaron cultivos O.N. de las células transformantes en medio líquido SCDO Glu (-Ura, -Leu) (5 ml) a 30°C sin δ -ALA (fase previa de ayuno). Al día siguiente se lavaron con H_2O_d estéril y se utilizaron para evaluar el crecimiento en medio sólido SCDO (-Ura, -Leu) suplementado con distintas concentraciones de hemina, mayores y menores a la estándar, así como en presencia de diferentes fuentes

de carbono (apartado 7.1.2 de Materiales y Métodos). Las concentraciones de hemina utilizadas fueron 5, 1, 0,5, 0,1, 0,05 y 0,01 μM ; las fuentes de carbono ensayadas fueron Glu, Gal⁹ y Gli-EtOH (sección IV.4.2). La Met se agregó a una concentración de 5 mg/l para permitir la expresión de los genes a partir del promotor *MET25*. Parte de los resultados obtenidos se muestran en la Figura 24, donde en el medio SCDO Glu se observó que las células que expresan la secuencia recombinante *TcHTE.HIS* crecieron mejor que el control aún a concentraciones de hemina menores que la concentración estándar. Sin embargo, en estas condiciones, las células transformadas con la secuencia *mtTcABCB.HIS* no mostraron diferencias de crecimiento respecto del control. Este resultado sugiere que *mtTcAbcB* no favorece la incorporación de hemo en *S. cerevisiae*, como sí lo hace *TcHTE*, es decir que *mtTcAbcB* no intervendría en la importación de hemo desde el exterior en *S. cerevisiae* lo que podría deberse a que no une el cofactor y/o a que no se expresa en membrana de la levadura.

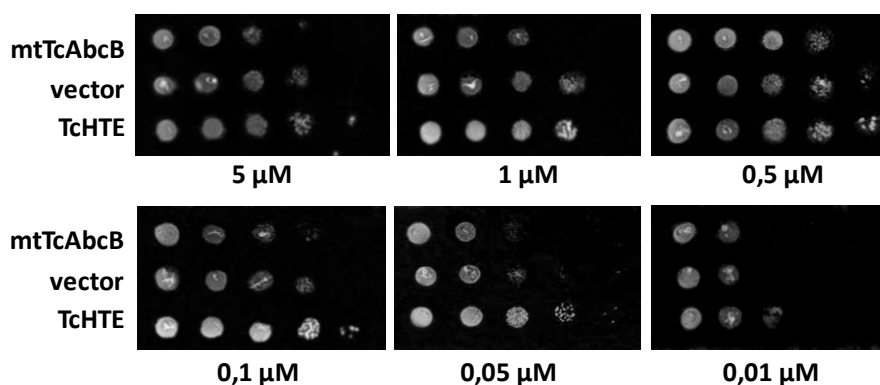


Figura 24. La proteína *mtTcAbcB* no permite el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae hem1Δ* en medio selectivo restrictivo para hemo. Ensayos de complementación en células de *S. cerevisiae hem1Δ* transformadas con pRS426M25 (vector), pRS426M25.*mtTcABCB.HIS* (*mtTcAbcB*) y pRS426M25.*TcHTE.HIS* (*TcHTE*). Las células se cultivaron en medio sintético SCDO Glu y las concentraciones de hemina que se indican bajo cada cuadro. La siembra se realizó por diluciones seriadas (sentido horizontal), siempre a la misma DO⁶⁰⁰ para cada cepa (sentido vertical), con el fin de comparar los crecimientos cuantitativamente. Fotografía tomada a los 4 días de incubación a 30°C.

En la condición en que se utilizó Glu como fuente de carbono, la captación de hemina mediante *TcHTE* pudo no haber favorecido directamente la respiración sino otras actividades celulares, también necesarias para el crecimiento en esta fuente de carbono fermentable. En cambio, al realizar el mismo ensayo en un medio suplementado con Gal o Gli-EtOH como fuentes de carbono no se observaron

⁹.En medio de cultivo conteniendo galactosa, otro azúcar fermentable, la levadura mantiene sus mitocondrias, a diferencia de lo que ocurre en un medio con glucosa.

diferencias en el crecimiento de las distintas transformantes *hem1Δ*. En particular, en medio suplementado con Gli-EtOH esperábamos que las células recuperasen su capacidad respiratoria con alguno de los transportadores de *T. cruzi*, entonces lo observado indicaría un escenario más complejo que debe ser abordado en más profundidad. En primer lugar, dado que *S. cerevisiae* biosintetiza hemo, puede no poseer un sistema de transporte para el ingreso del cofactor a la mitocondria. Por eso, es posible que la hemina ingresada al citosol -proceso facilitado por la presencia de TcHTE- quede en dicha localización, donde se incorporaría a las formas apo de hemoproteínas citosólicas necesarias para el crecimiento. Además, la concentración de hemo en citosol podría no ser suficiente para su incorporación a la mitocondria y permitir la respiración, proceso que es esencial en las condiciones ensayadas, aún cuando posea un transportador mitocondrial natural de la levadura; alternatively, la presencia de un transportador mitocondrial exógeno (por ejemplo, mtTcAbcB), podría no ser suficiente para transportar el hemo en la baja concentración en la que se encuentra en citosol. En segundo lugar, las células *hem1Δ* pueden perder parte o todo su ADN mitocondrial con las sucesivas divisiones celulares (fenotipo *rho-*). Entonces, aún cuando el hemo logre ingresar a la mitocondria, estas células no recuperarían su función respiratoria. Por último, existen reportes en la bibliografía que indican que estas células necesitan concentraciones de hemina mayores para crecer en fuentes de carbono no fermentables, a las necesarias en SCDO Glu (Huynh y col., 2012; Yuan y col., 2012).

Por otro lado, células de *S. cerevisiae* incapaces de sintetizar hemo, no sólo no pueden respirar, sino que tampoco pueden llevar a cabo otras reacciones O_2 dependientes. Como consecuencia, las células se vuelven auxótrofas para los productos de estas reacciones, a saber: ácidos grasos insaturados, esteroides, y metionina, los cuales deberán ser suplementados (Crisp y col., 2003). Experimentalmente, al someter estas células a ayuno de δ -ALA previo a un ensayo, hay que adicionar al medio de cultivo ergosterol (1,2 mg/ml), Tween 80 (fuente de ácidos grasos insaturados) y Met (0,05 mg/ml = 50 mg/l); esto se conoce como medio TEM. Alternativamente, se las puede incubar en bajas concentraciones de δ -ALA (0,5 μ g/ml), una concentración que las ayuna de hemo pero alcanza para preservar la viabilidad (Thorsness y col., 1989). El crecimiento de células deficientes de hemo en medio TEM

es cepa dependiente; aquellas que derivan de la cepa W303 son capaces de crecer en TEM en ausencia de hemo (Gaisne y col., 1999) y la no adición de estos compuestos afecta negativamente su proliferación (Crisp y col., 2003). Estas observaciones explicarían la ausencia de crecimiento tanto en SCDO Gli-EtOH como en SCDO Gal de las levaduras *hem1Δ* utilizadas en nuestros ensayos, que derivan de la cepa W303 y fueron incubadas previamente en condiciones de ayuno.

Adicionalmente, se intentó verificar la presencia de las formas recombinantes de la proteína mtTcAbcB por Western blot sobre extractos totales y no fue posible detectarlas (sección IV.6.5 y IV.6.3) así como tampoco lo fue por IFI. Se realizaron controles que permitieran corroborar la calidad de los anti-His comerciales (GE Healthcare) y verificamos que los mismos no estaban funcionando correctamente. Asimismo, la especificidad de anti-mtTcAbcB no pudo ser verificada en esta oportunidad. Entonces se decidió proseguir con otras estrategias para tratar de elucidar el rol de mtTcAbcB.

Ahora bien, aún si mtTcAbcB se ubicase en la mitocondria de *S. cerevisiae*, y fuese funcional, no tendría hemo para transportar porque no hay incorporación al citosol (recordemos que la *hem1Δ* tampoco lo sintetiza). Un esquema de lo que podría estar ocurriendo ante la expresión de cada transportador de *T. cruzi* en *S. cerevisiae* se representa en la Figura 25. Una combinación de mtTcAbcB junto con TcHTE en la misma célula y operando en las localizaciones que se esperan (membrana mitocondrial y membrana plasmática, respectivamente) tal vez permitirían a las células crecer mejor aún en Glu que cuando sólo portan TcHTE e incluso se esperaría que crezcan en Gli-EtOH.

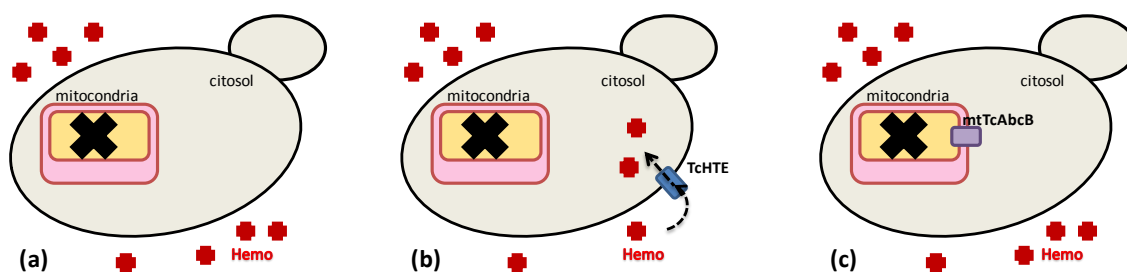


Figura 25. Esquema de la situación hipotética que experimentaría *Saccharomyces cerevisiae hem1Δ* en presencia de hemina al expresar los transportadores de *Trypanosoma cruzi*. (a) cuando no posee transportador alguno; (b) cuando expresa TcHTE y éste localiza en membrana plasmática; (c) cuando expresa mtTcAbcB y éste opera en membrana mitocondrial. En ninguna de las condiciones planteadas el hemo podría llegar desde el exterior celular hasta la mitocondria.

V.1.2.2.2 Expresión de mtTcAbcB.His-GFP en células *hem1Δ*

Al momento de realizar los experimentos anteriores, no se encontraba clonada la secuencia de mtTcAbcB.His-GFP ni la de TcHTE.His-GFP, que fueron utilizadas en un tiempo posterior al primer ensayo de complementación. Es así como, una vez obtenidas las secuencias recombinantes *mtTcABCB.HIS-GFP* y *TcHTE.HIS-GFP* clonadas en vectores de expresión en levaduras, las mismas se utilizaron para realizar ensayos similares a los descritos. La expresión de las proteínas de fusión a GFP nos permitiría corroborar su expresión y localización mediante técnicas de microscopía de fluorescencia. Se transformaron células de *S. cerevisiae hem1::LEU2* con el vector pRS426M25 conteniendo las secuencias génicas de mtTcAbcB.His, TcHTE.His, mtTcAbcB.His-GFP, TcHTE.His-GFP o ninguna (control). Una vez seleccionadas las células transformantes (sección IV.5.11), se evaluó cuantitativamente su crecimiento en medio SCDO, tanto en Glu como en Gli-EtOH como fuente de carbono y utilizando hemina o PP IX como fuente de hemo. Dado que la PP IX, el último intermediario en la biosíntesis de hemo, debe ser transportada hasta la mitocondria para finalmente ser convertida en hemo, su utilización por parte de la levadura es un indicador de que se produce el transporte del cofactor en la organela y que ésta se mantiene funcional. En cambio, la hemina puede ser utilizada directamente en el citosol una vez incorporada asegurando la viabilidad de la levadura sin necesariamente producirse la respiración, es decir, sin que la hemina sea transportada hasta la mitocondria. En resumen, permite distinguir de manera indirecta los mecanismos de transporte que se producen a nivel de membrana plasmática y a nivel de membrana mitocondrial. Las concentraciones ensayadas de cada porfirina fueron: 1, 0,5, 0,1, 0,05 y 0,01 μM en SCDO Glu y 10, 5 y 1 μM en SCDO Gli-EtOH (secciones IV.4.2 y IV.7.1.2).

Los resultados se muestran en la Figura 26, donde claramente se observa que la presencia de mtTcAbcB.His(-GFP) no favoreció el crecimiento respecto al control en medio SCDO Glu, utilizando hemina o PPIX. Sorprendentemente, en algunas de las oportunidades en que se repitió el ensayo las células que expresaban mtTcAbcB.His(-GFP) crecieron más débilmente que las células control. En este ensayo también fue confirmado que la presencia de la proteína TcHTE.His(-GFP) facilita la importación de hemo o PP IX. Cuando las células transformantes fueron desafiadas a crecer en SCDO Gli-EtOH, sólo las que expresaban TcHTE.His y TcHTE.His-GFP pudieron desarrollar

colonias en presencia de hemina pero no con PP IX. Dado que ninguna de las cepas ensayadas pudo crecer en SCDO Gli-EtOH suplementado con PP IX, podemos concluir que, en estas condiciones, no ocurriría el transporte mitocondrial de porfirinas.

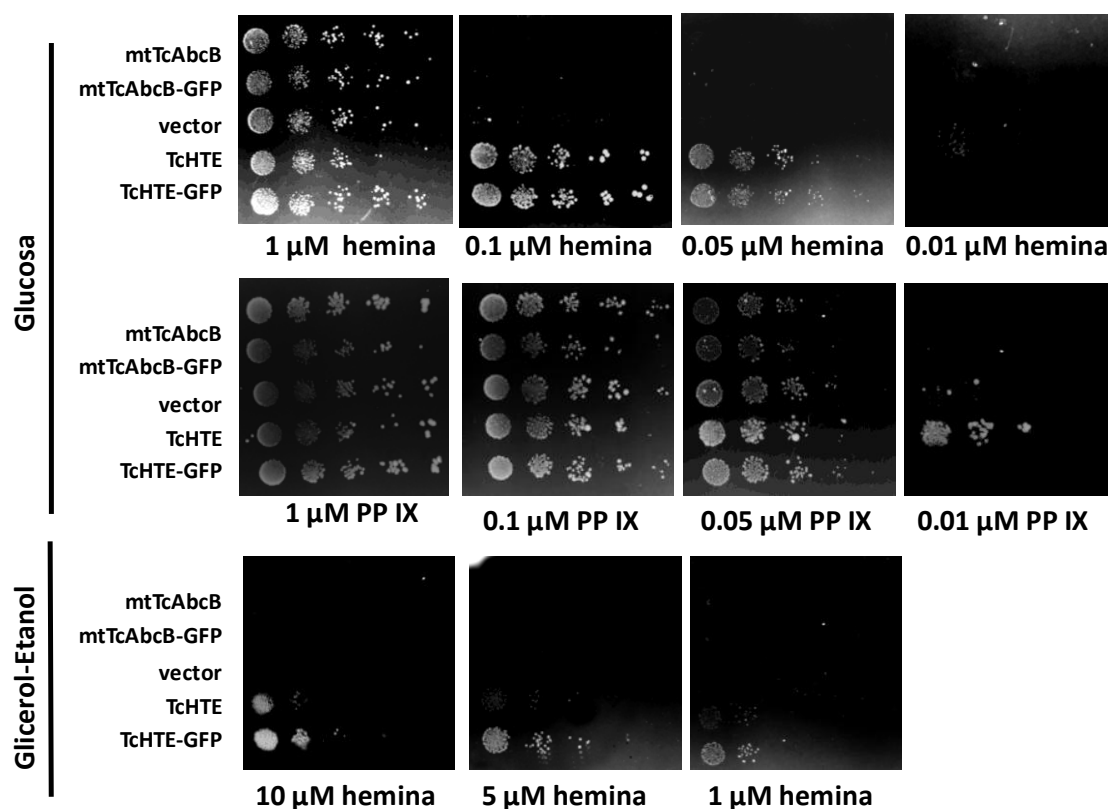


Figura 26. La proteína mtTcAbcB no permite el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae hem1Δ* en medio selectivo restrictivo para hemo. Ensayos de complementación en células de *S. cerevisiae hem1Δ* transformadas con pRS426M25 (vector), pRS426M25.mtTcABC.B.HIS (mtTcAbcB), pRS426M25.mtTcABC.B.HIS-GFP (mtTcAbcB-GFP), pRS426M25.TcHTE.HIS (TcHTE) y pRS426M25.TcHTE.HIS-GFP (TcHTE-GFP). Las células se cultivaron en medio sintético SCDO conteniendo Glu o Gli-EtOH como fuente de carbono y las concentraciones de porfirina que se indican bajo cada cuadro. La siembra se realizó por diluciones seriadas (sentido horizontal), siempre a la misma DO^{600} para cada cepa (sentido vertical), con el fin de comparar los crecimientos cuantitativamente. Se muestran algunas de todas las condiciones ensayadas, tras 10 días de incubación a 30°C.

Teniendo en cuenta que las células de levadura expresaban proteínas recombinantes con fusión a GFP, se evaluó la posible fluorescencia de las colonias cuando éstas fueron expuestas a luz azul (transiluminador Safe Imager de Invitrogen). Las colonias formadas por células *hem1Δ* que expresaban *TcHTE.HIS-GFP* mostraron tono verdoso, debido a la presencia de la proteína fusión en la membrana plasmática (Merli y Pagura y col., 2016). Por otro lado, las células *hem1Δ* que expresaban *mtTcABC.B.HIS-GFP* no mostraron esta coloración, lo que indica que mtTcAbcB.His-GFP presentaría alguna localización intracelular o bien que, por alguna razón aún no determinada, la expresión de la proteína recombinante no adoptaría la conformación

adecuada para emitir fluorescencia. Estas células fueron luego analizadas por microscopía de fluorescencia donde pudo verificarse la localización en membrana plasmática de TcHTE.His-GFP en contraste con una localización intracelular (posiblemente en vesículas) de mtTcAbcB.His-GFP como se muestra en la Figura 27 (sección IV.8.1). Estas imágenes también nos permitieron verificar que ambas proteínas se expresan en levadura. La identificación de mtTcAbcB en sus formas recombinantes no pudo ser corroborada por ensayos de Western blot sobre extractos totales de estas cepas transformantes por fallas en la especificidad de los anticuerpos utilizados, tanto anti-mtTcAbcB como anti-His, si bien se realizaron numerosos intentos (sección IV.6.5 y IV.6.3).

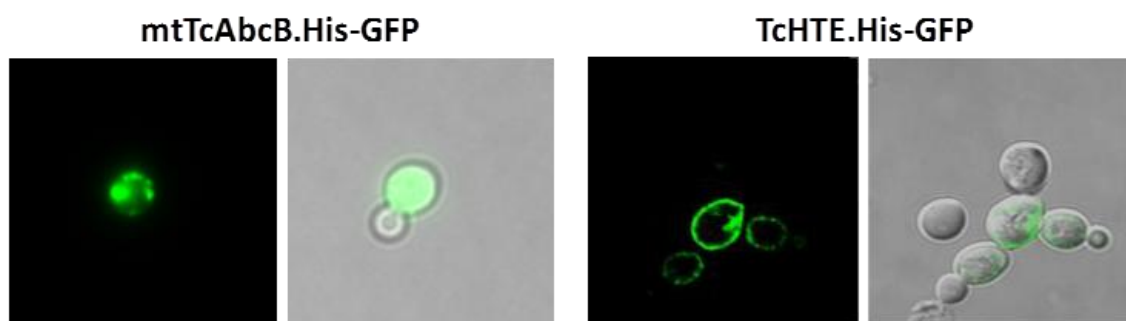


Figura 27. Expresión de TcAbcB.His-GFP y TcHTE.His-GFP en células de *Saccharomyces cerevisiae hem1Δ*. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células de *S. cerevisiae hem1Δ* transformadas con pRS426M25.mtTcABC.B.HIS-GFP y pRS426M25.TcHTE.HIS-GFP crecidas O.N. en medio SCDO Glu, -Ura -Leu, Met 10 mg/l.

En conjunto, estos resultados muestran que mtTcAbcB, en cualquiera de sus versiones recombinantes, no participaría en la incorporación de hemina o PP IX en células de *S. cerevisiae*. Aún así, no podemos descartar que mtTcAbcB actúe en el transporte de porfirinas en otra(s) localización(es) distinta de la membrana.

V.1.2.2.3 Expresión de mtTcAbcB y TcHTE en células *hem1Δ*

Teniendo en cuenta que TcHTE facilita el transporte de hemo a través de la membrana plasmática y considerando que mtTcAbcB podría intervenir en el transporte mitocondrial, nos propusimos evaluar la expresión simultánea de ambas proteínas recombinantes en las células *hem1Δ*. Si nuestra hipótesis fuese correcta y ambas proteínas recombinantes fueran funcionales en esta levadura, su coexpresión proporcionaría una ventaja frente a condiciones limitantes de hemina o PP IX al utilizar Gli-EtOH como fuente de carbono (Figura 28a). En esta oportunidad se utilizaron las células de *S. cerevisiae* cepa *hem1::HIS3* (sección IV.3.2), a las cuales se corroboró el

fenotipo por crecimiento en medio SCDO sin His. Luego, se procedió a la cotransformación de estas células con pRS414M25.*mtTcABCB.His* o pRS414M25.*mtTcABCB.His-GFP* junto con pRS426M25 portando las secuencias de TcHTE y los respectivos controles de la manera en que se describen en la Figura 28b. Como alternativa también se procedió a la transformación simple consecutiva con la misma combinación de plásmidos. A la fecha, y luego de numerosos intentos, sólo algunas de las dobles transformantes fueron obtenidas, determinando que este ensayo no progrese.

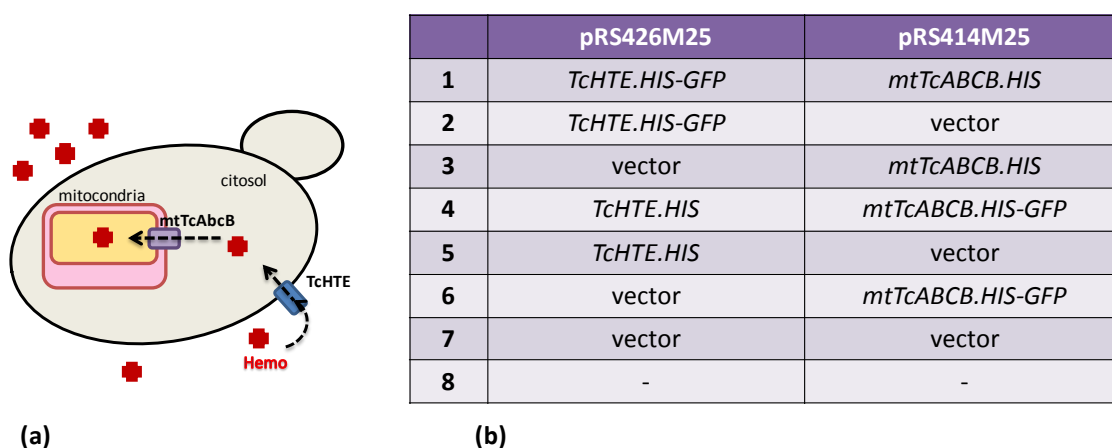


Figura 28. La coexpresión de *mtTcAbcB* y *TcHTE* en *Saccharomyces cerevisiae hem1Δ* le permitiría crecer en medio restrictivo para hemo. (a) Esquema propuesto para la localización y función de *mtTcAbcB* y *TcHTE* expresados en *S. cerevisiae*. (b) Protocolo de cotransformación propuesto para investigar la hipótesis planteada. Vector refiere al plásmido sin inserto.

V.1.2.2.4 Expresión de las formas recombinantes de *mtTcAbcB* en células *mdl2Δ*

Las razones para estudiar la complementación de células *mdl2Δ* se comentaron en página 101. Además, en simultáneo con este trabajo de Tesis, Horáková y colaboradores (Horáková y col., 2015) identificó, clonó y ensayó el gen *TbMdl* de *T. brucei*, que presenta alta homología de secuencia a *MDL1* y *MDL2* de *S. cerevisiae* y *AbcB10* de humanos, y con alta probabilidad de codificar para una proteína del tipo ABC mitocondrial. Como resultado de sus observaciones, se ha propuesto a *TbMdl* como transportador intracelular de hemo en *T. brucei*, necesario para importar hemo al interior de la mitocondria del parásito.

En nuestro laboratorio, se ensayó la capacidad de *mtTcAbcB.His*, con y sin fusión a GFP, de complementar células de levadura *mdl2Δ*. Para esto, células BY4743 (cepa silvestre) y células BY4743 *mdl2Δ::KanMX4* de *S. cerevisiae* fueron transformadas por el método químico con los vectores pRS426M25 portando el inserto

mtTcABCB.HIS, *mtTcABCB.HIS-GFP* y sin inserto (vector) (sección IV.3.2 y IV.5.11). Las células transformantes se seleccionaron por su crecimiento en SCDO Glu -Ura y posteriormente fueron ensayadas en placa en condiciones permisivas (Glu) y restrictivas (Gli-EtOH) en medio rico YP y sintético SCDO -Ura con concentraciones de Met de 0, 1, 5 y 20 mg/ml. Algunas fotografías representativas de los resultados se muestran en la Figura 29, donde se observa que en YDP (medio rico), no hay diferencias en el crecimiento de las células *mdl2Δ* respecto al control, lo que indicaría que la expresión de la proteína recombinante de *T. cruzi* no confiere ninguna ventaja frente a la ausencia de Mdl2. Tampoco se observaron diferencias de crecimiento cuando estas proteínas fueron expresadas en la cepa salvaje (BY4743); entonces, su presencia no afectaría el normal funcionamiento de estas células. En YPGli-EtOH no se observó crecimiento de ninguna de las células *mdl2Δ*, indicio de que la proteína *mtTcAbcB* no es capaz de complementar la función de Mdl2 de manera tal que las células recuperen su capacidad respiratoria. Los ensayos realizados en medio mínimo sintético SCDO mostraron resultados similares, es decir la expresión de la proteína recombinante de *T. cruzi* no fue capaz de complementar a *mdl2Δ*. Para nuestra sorpresa, estos resultados son muy diferentes de los obtenidos con *TbMdl*, que sí logró complementar (parcialmente) la delección *mdl2Δ* (Horáková y col., 2015). Por otro lado, en el genoma de *T. cruzi* no encontramos otro posible gen codificante para una proteína con homología a Mdl además de *mtTcAbcB*.

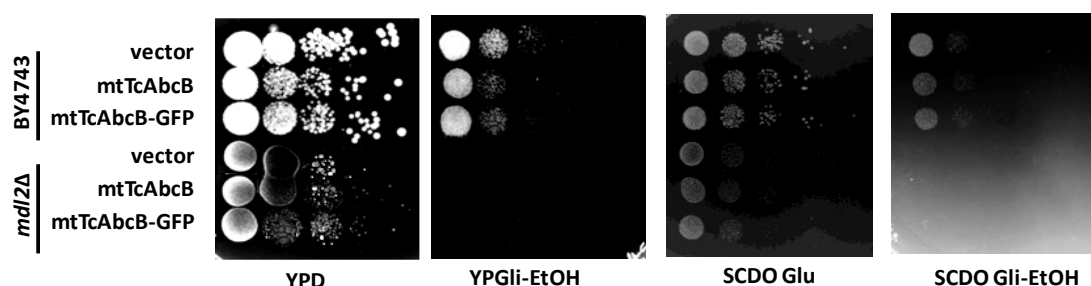


Figura 29. La proteína *mtTcAbcB* no permite recuperar la capacidad respiratoria de *Saccharomyces cerevisiae mdl2Δ*. Actividad de *mtTcAbcB.His* y *mtTcAbcB.His-GFP* por ensayos de complementación en células de *S. cerevisiae mdl2Δ* transformadas con pRS426M25 (vector), pRS426M25.*mtTcABCB.HIS* (*mtTcAbcB*) y pRS426M25.*mtTcABCB.HIS-GFP* (*mtTcAbcB-GFP*) y sembradas en medio rico (YP) y sintético SCDO conteniendo Glu o Gli-EtOH como fuente de carbono. En los medios SCDO se varió la concentración de Met entre 0 y 20 mg/ml pero no se observaron cambios. La siembra se realizó por diluciones seriadas (sentido horizontal), siempre a la misma densidad óptica (DO^{600}) para cada cepa (sentido vertical), con el fin de comparar los crecimientos cuantitativamente. Se muestran algunas de las placas obtenidas.

La fluorescencia debida a la fusión a GFP se visualizó por microscopía de fluorescencia en estas levaduras transformantes, revelando una localización intracelular, similar a lo ya observado en células DY5113 y *hem1Δ* transformadas con pRS426M25.*mtTcABCB.HIS-GFP* o pRS414M25.*mtTcABCB.HIS-GFP*.

El no obtener resultados en *S. cerevisiae mdl2Δ* no permite inferir sobre la función de mtTcAbcB en *T. cruzi* ya que el hecho de no lograr complementar la función de Mdl2 en levaduras no descarta su función como transportador en el parásito. Es poco probable que no se estén expresando correctamente los genes de *T. cruzi* dado que las microscopías confirman al menos la expresión de mtTcAbcB.His-GFP; tal vez su localización no sea la adecuada para revertir el fenotipo *mdl2Δ*.

V.1.2.2.5 Expresión de las formas recombinantes de mtTcAbcB en células *atm1Δ*

Para evaluar si mtTcAbcB es capaz de complementar la ausencia de Atm1, se analizó la reversión de las características fenotípicas que presentan las células *atm1Δ* por expresión de las formas recombinantes de mtTcAbcB. De todas, nos parecieron relevantes aquellas que pudiésemos reproducir fácilmente en el laboratorio, estas son el crecimiento débil en medio rico YP y nulo en medio mínimo SD (Sintético Depletado). La presencia de una proteína que compense al menos en parte la ausencia de Atm1 permitiría un mejor crecimiento en los medios mencionados. Si bien Atm1 está postulado ser un exportador mitocondrial de centros Fe-S, ha sido reportado que ABCB6 puede restaurar parcialmente el fenotipo de *atm1Δ* (Mitsubishi y col., 2000). De manera similar, esperamos que mtTcAbcB restaure al menos parcialmente la función de Atm1 en *S. cerevisiae*, y este resultado permitiría inferir un rol como posible transportador de hemo (y/o) porfirinas y una localización mitocondrial en levaduras.

Retomando los experimentos de complementación de células *atm1Δ* mencionados al principio de este capítulo, nos propusimos profundizar estos estudios. Para ello, se utilizó la cepa YPH500 *atm1::LEU2* disponible en el laboratorio (gentilmente cedida por el Profesor Roland Lill). En primer lugar, se analizó su crecimiento en medio SCDO en ausencia de Leu y en medio mínimo SD (Tabla IV) (secciones IV.3.2 y IV.4.2). En concordancia con lo reportado en la literatura, las células *atm1Δ* fueron capaces de crecer en SCDO -Leu pero no en medio SD (Kispal y col., 1997).

| SCDO | SD |
|---------------------------------|---------------------------------|
| YNB | YNB |
| NH ₄ SO ₄ | NH ₄ SO ₄ |
| Mix de AA | - |
| Glu | Glu |

Tabla IV. Comparación de los componentes presentes en los medios sintéticos SCDO de uso frecuente en nuestro laboratorio y SD.

Luego, estas células fueron transformadas con el plásmido pRS426M25 conteniendo las secuencias *mtTcABCB.HIS* y *mtTcABCB.HIS-GFP* o ninguna (control) y se seleccionaron por reversión de la auxotrofia de uracilo (SCDO Glu -Ura -Leu). El patrón de crecimiento de las células transformantes se analizó en medio SCDO Glu careciendo de los siguientes aminoácidos: Ura y Leu, Ura, Leu, o ninguno.

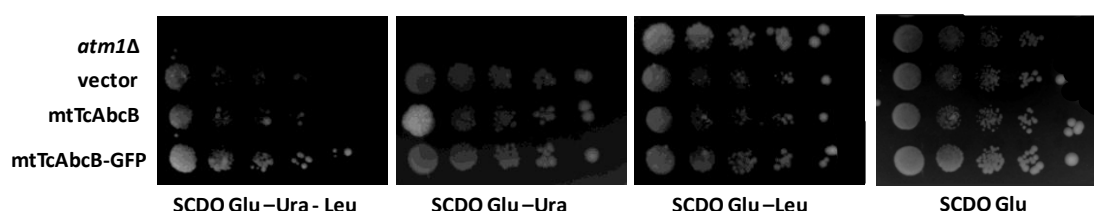


Figura 30. Actividad de mtTcAbcB.His y mtTcAbcB.His-GFP por ensayos de complementación en células de *Saccharomyces cerevisiae atm1Δ*. Las células fueron transformadas con pRS426M25 (vector), pRS426M25.*mtTcABCB.HIS* (mtTcAbcB) y pRS426M25.*mtTcABCB.HIS-GFP* (mtTcAbcB-GFP) y se cultivaron en medio sintético SCDO Glu sin los aminoácidos que se muestran bajo cada cuadro. La siembra se realizó por diluciones seriadas (sentido horizontal), siempre a la misma DO⁶⁰⁰ para cada cepa (sentido vertical), con el fin de comparar los crecimientos cuantitativamente.

Como se observa en la Figura 30, la presencia de las proteínas mtTcAbcB.His o mtTcAbcB.His-GFP no generó una mejora en el crecimiento de las levaduras *knock out* en las condiciones ensayadas, respecto del control. El mismo ensayo se realizó luego en medio SD y, en este caso, no se observó crecimiento de ninguna de las células.

Ante este resultado negativo, decidimos verificar la presencia de la proteína recombinante mtTcAbcB.His-GFP en las células transformantes mediante microscopía de fluorescencia. Las imágenes obtenidas, que se muestran en la Figura 31, muestran que las células presentaban la coloración típica verde de la proteína fusión.

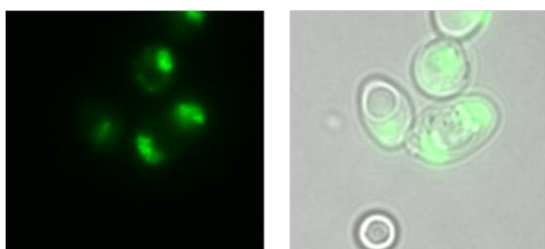


Figura 31. Células de *Saccharomyces cerevisiae atm1Δ* expresando mtTcAbcB.His-GFP. Imágenes de microscopía de células de levadura cepa YPH500 *atm1Δ* transformadas con pRS426M25.*mtTcABCB.HIS-GFP* crecidas O.N. en medio SCDO Glu, -Ura, Met 10mg/l vistas al microscopio de fluorescencia con filtro verde.

Estos resultados muestran que mtTcAbcB no es capaz de complementar la función de Atm1 en *S. cerevisiae*, al menos en las condiciones ensayadas. Una vez más, esto no excluye a mtTcAbcB como posible transportador de hemo en *T. cruzi*. Dado que las proteínas LmABCB3 y TbAtm, postuladas ser los heterólogos de Atm1 en *L. major* y *T. brucei*, respectivamente, revierten el fenotipo de *atm1Δ* (total y parcialmente en cada caso), esperábamos observar algo similar con mtTcAbcB.

Ante los resultados negativos obtenidos con mtTcAbcB, trabajamos en colaboración con el grupo de Pérez-Victoria del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" (Granada, España), responsables de la identificación y estudio del gen *LmAbcb3* de *L. major* (Martínez-García y col., 2016). Los vectores pRS414M25 conteniendo las construcciones génicas del transportador obtenidas, *mtTcABCB.HIS* y *mtTcABCB.HIS-GFP*, fueron enviados a M. Martínez-García para reproducir los ensayos de complementación en células *atm1Δ* en las condiciones por ellos utilizadas con los genes de *T. cruzi*. Los resultados preliminares que obtuvieron fueron negativos, tanto en la complementación de las levaduras como en la detección de las proteínas recombinantes por Western blot de extractos de estas células transformantes utilizando anticuerpos comerciales anti-His. Estos resultados, nos permiten descartar que la ausencia de complementación observada en nuestro laboratorio se deba a algún problema de diseño o con las cepas utilizadas, dejando abierto el interrogante acerca del rol de mtTcAbcB como posible transportador de hemo mitocondrial.

V.1.3 Estudio de la proteína mtTcAbcB en *Trypanosoma cruzi*. Perspectivas

La finalidad última de los experimentos antes mencionados, fue elucidar la función de la proteína codificada por el gen *mtTcABCB* de *T. cruzi*, de forma preliminar al estudio de la proteína en el organismo nativo.

Las secuencias recombinantes *mtTcABCB.HIS* y *mtTcABCB.HIS-GFP* se clonaron en el vector pTcINDEX para luego obtener transfectantes estables de parásitos de *T. cruzi* Dm28c pLEW13. Con éstos se espera determinar el efecto que causaría la sobreexpresión de esta proteína en epimastigotes de *T. cruzi*. En un trabajo previo se logró transfectar epimastigotes de *T. cruzi* con el vector pTrex-n conteniendo el gen *mtTcABCB.c-MYC*; ensayos preliminares no mostraron diferencia fenotípica entre los

parásitos transfectantes y los del tipo salvaje en condiciones estándares de crecimiento. Sin embargo, estos estudios se deben completar y profundizar. Para ello se plantea obtener nuevos parásitos transfectantes portando las secuencias obtenidas en este trabajo de Tesis. Posteriormente se propone analizar la expresión y localización de las proteínas expresadas, así como determinar si las mismas provocan algún efecto en el crecimiento de *T. cruzi*, en la acumulación de hemo, entre otros. Además, en las nuevas versiones recombinantes del transportador, mtTcAbcB.His y mtTcAbcB.His-GFP, la etiqueta de 6 His proporciona no sólo una manera adicional de detectar la proteína utilizando anticuerpos específicos anti-His sino que también posibilita su purificación por cromatografía de afinidad. Por otro lado, la fusión a GFP constituye también una forma de detección mediante anticuerpos específicos, mientras que la fluorescencia intrínseca de esta proteína permite la detección, localización y estimación de la inducción de la proteína fusión.

Asimismo, el análisis de la proteína *in vivo* puede realizarse mediante IFI con los anticuerpos policlonales purificados anti-P2(TcAbcB) y a través de medidas de hemo intracelular en parásitos crecidos en distintas concentraciones de hemina. Y una vez purificada la proteína mtTcAbcB.His sería posible llevar a cabo los estudios para su caracterización bioquímica *in vitro*. Para ello, se deberá diseñar y optimizar las condiciones para la purificación de mtTcAbcB.His. Posteriormente realizar estudios *in vitro*, con los que se evaluarían las propiedades de unión a hemo o a precursores de hemo de esta proteína, realizando ensayos de competencia de la unión a la resina de afinidad “Hemin-agarosa” de manera similar a lo realizado en la caracterización de ABCB6 de mamíferos (Krishnamurthy y col., 2006).

Por último, también se propone repetir los ensayos de Leprohon y colaboradores (2006) y confirmar los resultados del patrón de expresión diferencial del gen de *mtTcABCB* mediante la técnica de qPCR. Dado que los datos publicados en TriTryp.DB refieren a otra cepa, es posible que la expresión del gen en cuestión difiera entre las distintas cepas de *T. cruzi*. Por esto, se debe verificar el perfil de expresión en la cepa de trabajo. Las razones para una expresión cepa dependiente se desconocen. Además, será interesante determinar si este perfil de expresión varía cuando el medio de cultivo es suplementado con distintas concentraciones de hemina.

En un futuro, la generación de nuevas versiones recombinantes no funcionales pueden contribuir al reconocimiento de función de mtTcAbcB, permitiendo identificar regiones críticas para la función del transportador (Mitsubishi y col., 2000) y la evaluación del efecto que éstas puedan tener sobre el crecimiento, supervivencia, tráfico de hemo, etc.

V.1.4 Conclusiones

Como objetivo general de este trabajo se propuso elucidar cómo el hemo es distribuido intracelularmente en *T. cruzi* y, particularmente, cómo llega a la mitocondria para su posterior incorporación como cofactor de proteínas específicas (como tal, o previa conversión a hemo A). Para ello nos planteamos estudiar la función de proteínas de *T. cruzi* con posible rol en el transporte y en el metabolismo de hemo hacia el interior de la mitocondria del parásito.

Respecto al transporte de hemo, previamente se identificó el gen codificante para una proteína de *T. cruzi*, a la cual denominamos mtTcAbcB por su alta homología al transportador mitocondrial ABCB6 de humanos.

En el presente trabajo de Tesis, se obtuvieron las siguientes herramientas moleculares para desarrollar los ensayos propuestos:

- ✓ se construyó la secuencia recombinante *mtTcABCB.HIS-GFP* y la misma, al igual que la de *mtTcABCB.HIS*, se clonó en vectores apropiados de expresión en levaduras y epimastigotes de *T. cruzi*.
- ✓ se construyó el vector de expresión en levaduras pRS414M25 a partir del pRS414 (el cual confiere autotrofia para Trp) y un casete promotor *MET25-CYC1* terminador. El mismo permite el estudio de función de genes en cepas incapaces de sintetizar Trp y que además porten el pRS426.
- ✓ se obtuvieron anticuerpos policlonales anti-mtTcAbcB purificados a partir de suero inmune de conejo.

La expresión de versiones recombinantes de mtTcAbcB en diferentes cepas de *S. cerevisiae*, permite postular lo siguiente:

- ✓ la visualización de mtTcAbcB.His-GFP por microscopía de fluorescencia permite verificar la expresión de *mtTcABCB.HIS-GFP* en levaduras.

✓ mtTcAbcB no se localizaría en membrana plasmática de levaduras, sino en posibles vesículas intracelulares.

✓ Los ensayos de complementación heteróloga en *S. cerevisiae hem1Δ* mostraron que mtTcAbcB.His(-GFP) no participaría del transporte de hemo en membrana plasmática de levadura.

✓ Los ensayos de complementación heteróloga en *S. cerevisiae atm1Δ* mostraron que mtTcAbcB no estaría involucrada en el transporte de centros Fe-S u hemo a través de membrana mitocondrial.

✓ mtTcAbcB no participaría en el transporte mitocondrial del sustrato necesario que permita la recuperación la capacidad respiratoria de células *mdl2Δ*.

Estos resultados no nos permiten postular una función específica para mtTcAbcB ni tampoco su localización en *T. cruzi*, organismo en el cual muchas aproximaciones experimentales restan por hacer. Dada la ausencia de vías metabólicas de biosíntesis de hemo en *T. cruzi*, y al no existir evidencia sobre una vía de degradación ni de depósitos de almacenamiento, el estudio del transporte de hemo en el parásito continúa siendo un tópico sumamente relevante, que debe ser estudiado.

V.2 TcCox10 y la biosíntesis de hemo A en *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi presenta un metabolismo fermentativo aeróbico, es decir que no puede independizarse del consumo de oxígeno a pesar de realizar fermentación y por ello necesita una cadena mitocondrial activa (Tielens y van Hellemond, 2009). Existen numerosas evidencias que sugieren la existencia de múltiples oxidasas terminales dando lugar a una cadena respiratoria ramificada, donde la oxidasa terminal principal, responsable del 94 % del consumo de oxígeno en epimastigotes, es una CcO del tipo aa_3 (Affranchino y col., 1986; Silva y col., 2011; Tielens y van Hellemond, 2009). En nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que *T. cruzi* depende de la actividad de la CcO durante todo su ciclo de vida, en consecuencia la síntesis, distribución y ensamblado de hemo A serían también esenciales para este parásito (Merli y col., 2017).

V.2.1 Análisis de la enzima HOS en *Trypanosoma cruzi*. Resultados previos obtenidos en el laboratorio

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se planteó como objetivo de estudio determinar si *T. cruzi* puede adquirir el hemo A de su entorno o si es capaz de sintetizarlo a partir de hemo B y, en este caso, si la biosíntesis ocurriría de manera similar a los demás eucariotas. Se identificaron en el genoma de *T. cruzi* (El Sayed y col., 2005) secuencias codificantes para proteínas con homología de secuencia a las enzimas HOS y HAS de *S. cerevisiae* y se las denominó *TcCOX10* y *TcCOX15*, respectivamente (Tc00.1047053509601.59 es *TcCOX10*, y Tc00.1047053511211.70 es *TcCOX15*) (Buchensky y col., 2010). La actividad HOS y HAS fue confirmada mediante ensayos de complementación de células de *S. cerevisiae knock out* para los genes *COX10* y *COX15* (*cox10Δ* y *cox15Δ*, respectivamente). Además, como controles, se transformaron estas células *knock out* con plásmidos de expresión constitutiva conteniendo las secuencias *ScCOX10.HIS* y *ScCOX15.HIS* (HOS y HAS de *S. cerevisiae*, ambas con cola de 6 histidinas en C-terminal). Las células mutantes *cox10Δ* y *cox15Δ* presentan deficiencia respiratoria debido a que no pueden sintetizar hemo A y en consecuencia carecen de una CcO funcional. Esto impide su crecimiento en un medio que posea un sustrato no fermentable como única fuente de carbono, por ejemplo glicerol. Se evaluó el crecimiento de las células de levadura *cox10Δ* y *cox15Δ* en 2

medios distintos, uno suplementado con una fuente de carbono fermentable (Glu), y otro con una fuente de carbono no fermentable (Gli-EtOH). Se observó que dichas células recuperaron la función respiratoria cuando expresaban en *trans* los genes de *T. cruzi* correspondientes, de manera similar al control con genes propios de *S. cerevisiae* (Figura 32). Esto indica claramente que las secuencias *TcCOX10* y *TcCOX15* codifican para una HOS y una HAS funcionales en el organismo heterólogo *S. cerevisiae* (Buchensky y col., 2010).

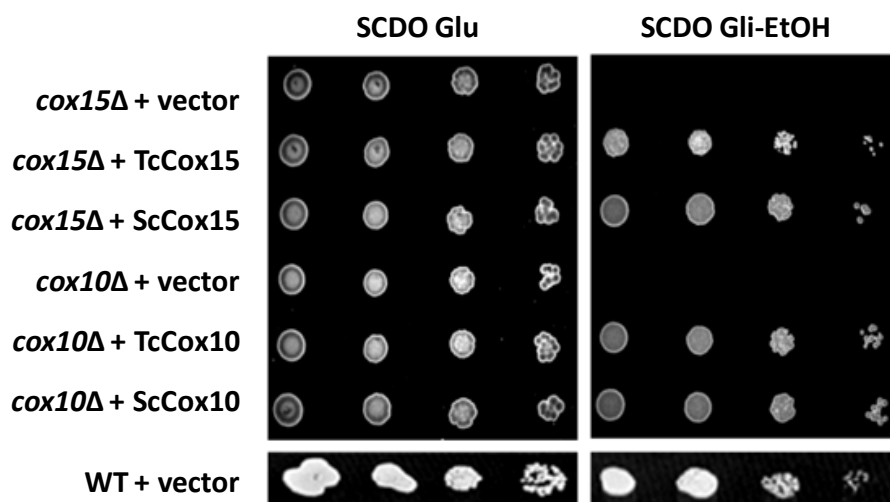


Figura 32. Ensayos de complementación en células de *Saccharomyces cerevisiae* *cox10Δ* y *cox15Δ* con los genes *COX10* y *COX15* de *Trypanosoma cruzi*. Se evaluó la capacidad respiratoria de células de levadura mutantes *cox10Δ* y *cox15Δ* transformadas con plásmidos de expresión conteniendo las secuencias *TcCOX10* y *TcCOX15* de *T. cruzi* y las secuencias *ScCOX10* y *ScCOX15* de *S. cerevisiae*. Para ello las diluciones seriadas de cada cultivo se sembraron en SCDO Glu -Ura y SCDO Gli-EtOH -Ura. WT, células salvajes. Figura adaptada de Buchensky y col., 2010.

Además, se detectó la presencia de los distintos tipos de hemo: B, C y A, en extractos mitocondriales de estas células transformadas, mediante espectroscopía de absorción diferencial en la región visible. En todos los cultivos ensayados se observaron las señales correspondientes a las bandas α de los hemos B y C (a 560 y 550 nm, respectivamente) que se solapan en una única banda en el espectro de absorción diferencial en la región visible. El hemo A, que presenta un pico de absorción máximo a aproximadamente 605 nm (Tzagoloff y col., 1975), no se detectó en mitocondrias de levaduras *knock out* *cox10Δ* y *cox15Δ* transformadas con vector control, pero sí en aquellas que expresaban *en trans* las HOS y HAS respectivamente, de *S. cerevisiae* (*ScCOX10* y *ScCOX15*) o de *T. cruzi* (*TcCOX10* y *TcCOX15*). Además, se corroboró la expresión de todas estas proteínas mediante ensayos de Western blot

sobre extractos mitocondriales de cada cultivo. En conclusión, se comprobó la función de HOS y HAS, respectivamente, de las proteínas de *T. cruzi* TcCox10 y TcCox15, y que, además, se expresaron y ensamblaron correctamente en las mitocondrias de levaduras (Buchensky y col., 2010).

Por otro lado, se analizaron los niveles de ARNm correspondientes a los genes *TcCOX10* y *TcCOX15* en los distintos estadios de vida del parásito por medio de PCR cuantitativa en tiempo real. Los niveles mayores de ARNm fueron detectados en los estadios de epimastigote y tripomastigote metacíclico, mientras que el nivel mínimo correspondió a los amastigotes. Esto podría reflejar diferentes requerimientos respiratorios según el estadio (Buchensky y col., 2010).

Para obtener anticuerpos policlonales específicos de conejo anti-TcCox10 y anti-TcCox15 como herramienta de trabajo, regiones de alta antigenicidad de cada proteína fueron clonadas y expresadas en *E. coli* de manera independiente, purificadas y utilizadas como antígeno en conejos del servicio de bioterio de nuestra facultad (FCByF-UNR), de manera similar a como se procedió con mtTcAbcB (Menéndez Bravo, 2011). En nuestro laboratorio, estos anticuerpos fueron purificados a partir de suero inmune y utilizados para detectar las proteínas correspondientes en distintas técnicas, como se comenta más adelante.

Además, se avanzó en estudios de función y esencialidad de TcCox10 y TcCox15 en *T. cruzi*. Para ello se procedió al diseño y construcción de mutantes puntuales de ambas proteínas, modificándose residuos previamente reportados como esenciales para su actividad en otros organismos. Las modificaciones realizadas fueron N128K, R144-R148A y H248A para TcCox10 que corresponden a N196, R212-R216 y H317 en Cox10 de *S. cerevisiae* (Bestwick y col., 2010) y H129A, H206A y H307A para TcCox15 que corresponden a H169A, H245A y H368A en la numeración de ScCox15 (Hederstedt y col., 2005). Las secuencias modificadas fueron clonadas en el vector pRS426M25. La actividad de las proteínas mutantes, denominadas TcCox10 M1 (TcCox10 N128K), TcCox10 M2 (TcCox10 H248A), TcCox10 M3 (TcCox10 R144-R148A), TcCox15 M1 (TcCox15 H129A), TcCox15 M2 (TcCox15 H206A) y TcCox15 M3 (TcCox15 H307A) para mayor simplicidad, primero fue analizada por complementación de función en *S.*

cerevisiae *cox10Δ*¹⁰ y *cox15Δ*¹¹, de manera similar a lo realizado para caracterizar las enzimas TcCox10 y TcCox15 silvestres. Las células *knock out* transformadas con plásmidos conteniendo los genes *TcCOX10* y *TcCOX15* mutantes no pudieron revertir su deficiencia respiratoria, como si lo hacía la proteína salvaje correspondiente (Figura 33). La presencia de las proteínas mutantes nuevamente se confirmó mediante ensayos de Western blot, en donde se observaron niveles proteicos similares tanto para las proteínas mutantes como para la salvaje, es decir que no se modificó la expresión o la acumulación de las mismas en levadura sino su actividad.

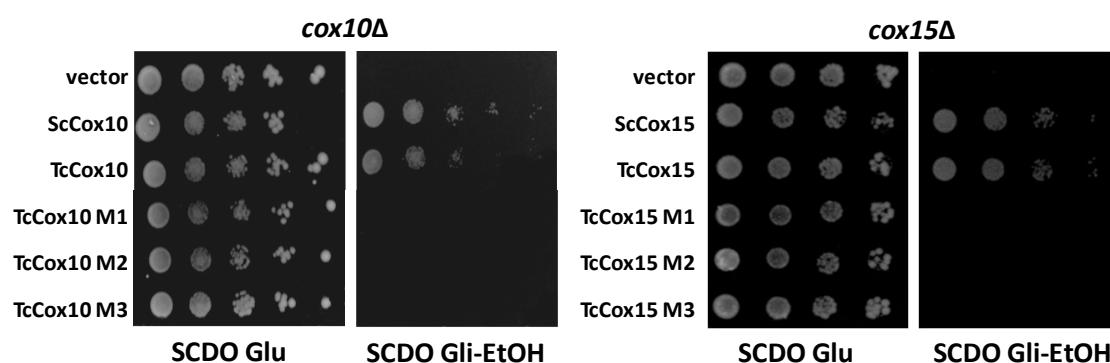


Figura 33. Análisis de la expresión de versiones salvaje y mutantes de *TcCOX10* y *TcCOX15* en células de *Saccharomyces cerevisiae* *cox10Δ* y *cox15Δ*. Izquierda: Diluciones seriadas de *S. cerevisiae* *cox10Δ* complementadas con pRS426M25 (vector), pRS426M25.ScCOX10.HIS (ScCox10), pRS426M25.TcCOX10.HIS (TcCox10), pRS426M25.TcCOX10.HIS.M1 (TcCox10 M1), pRS426M25.TcCOX10.HIS.M2 (TcCox10 M2) y pRS426M25.TcCOX10.HIS.M3 (TcCox10 M3). Derecha: diluciones seriadas de *S. cerevisiae* *cox15Δ* complementadas con pRS426M25 (vector), pRS426M25.ScCOX15.HIS (ScCox15), pRS426M25.TcCOX15.HIS (TcCox15), pRS426M25.TcCOX15.HIS.M1 (TcCox15 M1), pRS426M25.TcCOX15.HIS.M2 (TcCox15 M2) y pRS426M25.TcCOX15.HIS.M3 (TcCox15 M3). El crecimiento se evaluó en medio SCDO -Ura empleando una fuente de carbono fermentable (Glu) y una fuente de carbono no fermentable (Gli-EtOH). Figura adaptada de Tesina de grado de Lucía V. Ferrero (2014) y Merli y col., 2017.

Para determinar el efecto que causa la sobreexpresión *en trans* de estas proteínas en el parásito *T. cruzi*, se clonaron el gen *TcCOX10* y el gen *TcCOX15* salvajes y las versiones mutantes en el vector pTcINDEX (Taylor y Kelly, 2006). Se transfectaron epimastigotes de *T. cruzi* Dm28c conteniendo el plásmido pLEW13 con estas construcciones y luego de seleccionarlos se realizaron curvas de crecimiento a diferentes concentraciones de Tet de manera tal de inducir la expresión de los genes recombinantes. En el caso de TcCox15, la sobreexpresión de las HAS mutantes tuvieron

¹⁰ Tesina de grado de L. V. Ferrero, titulada "Estudio estructural y funcional de la enzima Hemo O Sintasa de *Trypanosoma cruzi*". Directora: Dra. Julia A. Cricco

¹¹ Trabajo desarrollado durante la Tesis Doctoral de M. L. Merli, titulada "Transporte de hemo y bioíntesis de hemo A en *Trypanosoma cruzi*". Directora: Dra. Julia A. Cricco

un efecto deletéreo sobre el crecimiento de los epimastigotes, no así el vector control o la forma salvaje de la proteína. Se ha postulado que estas enzimas deben oligomerizar (Bestwick y col., 2010; Brown y col., 2004; Bareth y col., 2013) y/o formar complejos multiproteicos para llevar a cabo su función, por lo que se cree que las formas no funcionales de HAS puedan estar alterando de alguna manera la formación de estos complejos.

Utilizando los anticuerpos anti-TcCox15 obtenidos en el laboratorio, se detectó la proteína TcCox15 endógena por Western blot en todos los estadios, en cambio la señal observada por microscopías (IFI) fue muy débil y no pudo asignarse una localización para la proteína. En parásitos transfectantes que sobreexpresaron la versión salvaje, hecho corroborado por Western blot, pudo determinarse una localización mitocondrial de estas proteínas por Microscopía confocal de epimastigotes fijados utilizando anticuerpos anti-TcCox15 y anti-His (IFI). El estudio de TcCox15 fue parte del trabajo de Tesis doctoral del Dr. Marcelo L. Merli y dio origen a la publicación de título "Heme A synthesis and CcO activity are essential for *Trypanosoma cruzi* infectivity and replication" (Merli y col., 2017).

Respecto al estudio de TcCox10, tras obtener transfectantes portando las distintas formas de *TcCOX10*, se observó que la sobreexpresión de las formas mutantes no funcionales de la HOS no afectaron el crecimiento del parásito mientras que resultados preliminares al sobreexpresar TcCox10 silvestre mostraron un efecto deletéreo en los epimastigotes transfectantes. En cambio cuando se intentó detectar TcCox10 endógena en epimastigotes y tripomastigotes de Dm28c, la señal obtenida por microscopía con los anti-TcCox10 reveló una localización inespecífica y que no superponía con la del marcador mitocondrial MitoTracker, mientras que por Western blot no pudo ser detectada en los distintos estadios. Como alternativa se propuso hacer este estudio mediante la fusión de la secuencia de la proteína a un etiqueta; para esto se diseñó la proteína TcCox10 recombinante como fusión a GFP en su extremo C-terminal, inmediatamente posterior a la etiqueta de 6 histidinas (His) presente en todas las construcciones utilizadas.

En este contexto, como parte de los objetivos de la presente Tesis doctoral, nos propusimos construir y expresar la proteína recombinante TcCox10.His-GFP y para ello realizamos las aproximaciones experimentales que se detallan en esta sección.

V.2.2 Resultados

V.2.2.1 Obtención de herramientas moleculares para el estudio de TcCox10

Para el estudio de localización de TcCox10 se generó una nueva versión recombinante con fusión a GFP en C-terminal, a partir de la secuencia para TcCox10.His ya presente en el laboratorio. Esta versión permitiría, una vez corroborada su funcionalidad, determinar la localización intracelular de la enzima HOS de *T. cruzi* en ensayos de microscopía y de Western blot tanto en levaduras como en epimastigotes.

V.2.2.1.1 Construcción de la secuencia recombinante *TcCOX10.HIS-GFP*

Para completar y profundizar el estudio de la enzima HOS de *T. cruzi* se diseñó y construyó, a partir del gen *TcCOX10.HIS* disponible en el laboratorio, una versión que permita la expresión de la proteína con la adición en C-terminal de GFP, TcCox10.His-GFP (denominación del gen recombinante *TcCOX10.HIS-GFP*). La estrategia utilizada para ello fue similar a la utilizada para obtener *mtTcABCB.HIS-GFP* (sección 5.3.1 y 5.3.2 de Materiales y Métodos). Esto es, se amplificó *TcCOX10.HIS* mediante la técnica de PCR a partir del vector pENTR3C.*TcCOX10.HIS* (Tabla I, sección IV.2.1). Se utilizaron cebadores que permitieron la eliminación del codón *stop* ubicado en sentido 3' de la cola de 6 histidinas manteniendo los sitios de restricción para las enzimas *Bam*H I en 5' y *Xho* I en 3' del gen; estos cebadores son FP.TcCox10B y RevHis-noStop de Tabla II en sección IV.2.2. El producto obtenido (*TcCOX10.HISnonstop*) de 1200 pb se clonó luego en el vector pENTR3C a través de los sitios de restricción mencionados. Con el producto de la reacción de ligación se transformaron células de *E. coli* DH5 α que fueron seleccionadas en medio sólido LB Kan 50 μ g/ml (secciones IV.5.3.1, IV.5.4, IV.5.5, IV.5.6, IV.5.7 y IV.5.8, IV.3.1). De las colonias obtenidas, se seleccionaron 8 al azar para verificar la correcta construcción del vector mediante PCR de colonia utilizando los cebadores FP.TcCox10B y RevHis-noStop (sección IV.5.9 y IV.5.4). Un total de 7 colonias resultaron positivas (las #2 a #8), a 3 de estas se les extrajo el ADN plasmídico que se verificó por patrón de restricción y secuenciación (secciones IV.5.1, IV.5.6, IV.5.4 y IV.5.10). A modo de ejemplo se muestra uno de los geles obtenidos durante el proceso de clonado en la Figura 34. Una vez verificada la correcta construcción del vector pENTR3C.*TcCOX10.HISnonstop*, los 3 clones de células de *E.*

coli transformantes (las #3, #5 y #8) y sus respectivos plásmidos se almacenaron de la manera habitual (sección IV.4.4 y IV.5).

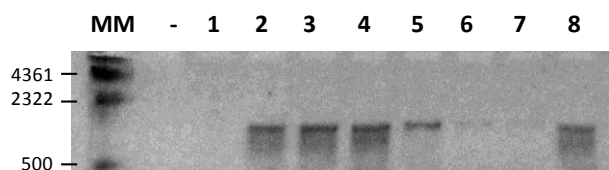


Figura 34. Gel de agarosa al 1 % p/v mostrando los productos de amplificación de la PCR de colonia (de 1200 pb) realizada sobre células de *E. coli* DH5 α transformadas con las mezclas de ligación pENTR3c – inserto (*TcCOX10.HISnonstop*).

Por otro lado, la misma secuencia codificante de la GFP que fuera amplificada para la construcción de *mtTcABCB.HIS-GFP* (Capítulo 1 de Resultados y sección IV.5.3.2) fue utilizada en este caso para generar la proteína de fusión TcCox10.His-GFP siguiendo un protocolo similar. El producto de PCR *GFP* de 747 pb fue clonado en el vector pENTR3C.*TcCOX10.HISnonstop* a través de los sitios *Xho* I y *Xba* I en 3' y en fase con la secuencia presente de la HOS (apartados 5.6, 5.4, 5.5 y 5.7 de sección IV). La mezcla resultante de la reacción de ligación se utilizó para transformar células de *E. coli* DH5 α competentes que fueron seleccionadas en medio con Kan 50 μ g/ml (sección IV.5.8). De las colonias obtenidas, se seleccionaron 11 al azar en las que se analizó la presencia del inserto *GFP* por PCR de colonia utilizando los cebadores FPpTcGFPN-3 y RPpTcGFPN-5 (sección IV.5.9 y IV.5.4). En éstas, 5 resultaron positivas (las colonias #1, #3, #4, #7 y #8), por lo que se procedió a la extracción del ADN plasmídico de las mismas (que denominamos pENTR3C.*TcCOX10.HIS-GFP*) y posterior digestión con *Sal* I (sección IV.5.1 y IV.5.6). La enzima *Sal* I corta el ADN inmediatamente en 3' de la secuencia de *GFP* y en un sitio interno del vector inmediatamente en 5' del inserto, generando fragmentos de 2263 pb (vector) y 1924 pb (secuencia *TcCox10.HIS-GFP*). En los 5 clones analizados se observó el patrón de digestión esperado (Figura 35) (sección IV.5.4). De éstos, 3 se verificaron además por secuenciación utilizando los cebadores que hibridan en los sitios ext-*att*L1 y ext-*att*L2 del vector y, adicionalmente a partir de un sitio interno del gen donde hibrida el cebador F2TcCox10 que permite determinar la secuencia por sobre la región de empalme *HIS-GFP* (sección IV.5.10). Los clones pENTR3C.*TcCOX10.HIS-GFP* #1 y #3 resultaron poseer la secuencia correcta y fueron almacenados en *stock* (sección IV.4.4 y IV.5).

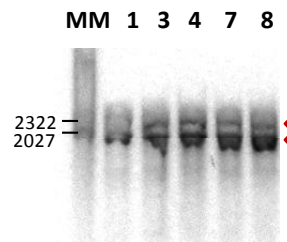


Figura 35. Patrón de digestión observado para pENTR3C.*TcCOX10.HIS-GFP* clones #1, #3, #4, #7, y #8 tratados con la enzima *Sal* I y visualizados en gel de agarosa al 1 %.

V.2.2.1.2 Clonado de la secuencia recombinante *TcCOX10.HIS-GFP* en vectores de expresión disponibles

Luego de obtener la construcción para expresar la proteína de fusión TcCox10.His-GFP, el objetivo siguiente fue ensayar su expresión y funcionalidad tanto en levaduras como en el parásito *T. cruzi*. Para evaluar su expresión en levaduras, la secuencia génica que codifica para TcCox10.His-GFP se clonó en el vector pRS426M25 (Tabla I, sección IV.2.1) a través de los sitios de restricción para las enzimas *Bam*H I y *Sal* I. En segundo lugar, se clonó la secuencia *TcCOX10.HIS-GFP* (digerida con las enzimas *Bam*H I y *Eco*R V), entre los sitios *Bam*H I y *Nru* I del vector pTcINDEX (Tabla I, sección IV.2.1) para evaluar su expresión en *T. cruzi*. Los productos de cada ligación se utilizaron para transformar células de *E. coli* DH5α competentes (apartados 5.6, 5.4, 5.5, 5.7 y 5.8 de sección IV). Las células transformantes se seleccionaron por su resistencia a Amp 150 µg/ml y de las colonias obtenidas, 11 fueron analizadas por PCR de colonia para verificar la presencia del inserto (sección IV.5.9). Posteriormente, se purificó ADN plasmídico de 3 clones de cada transformación y se verificó el clonado correcto por reacciones de digestión para pRS426M25.*TcCOX10.HIS-GFP* y por secuenciación para pTcINDEX.*TcCOX10.HIS-GFP* (oligos FP_HX1 y RP_Ig.Act) (sección IV.5.1, IV.5.6, IV.5.4 y IV.5.10). Por último, los clones obtenidos pRS426M25.*TcCOX10.HIS-GFP* #2, #3 y #5 y pTcINDEX.*TcCOX10.HIS-GFP* #1, #2 y #3, cuya construcción fue verificada, se almacenaron de la forma habitual (sección IV.4.4 y IV.5).

La estrategia de los clonados mencionados en esta sección se esquematizan en la Figura 36.

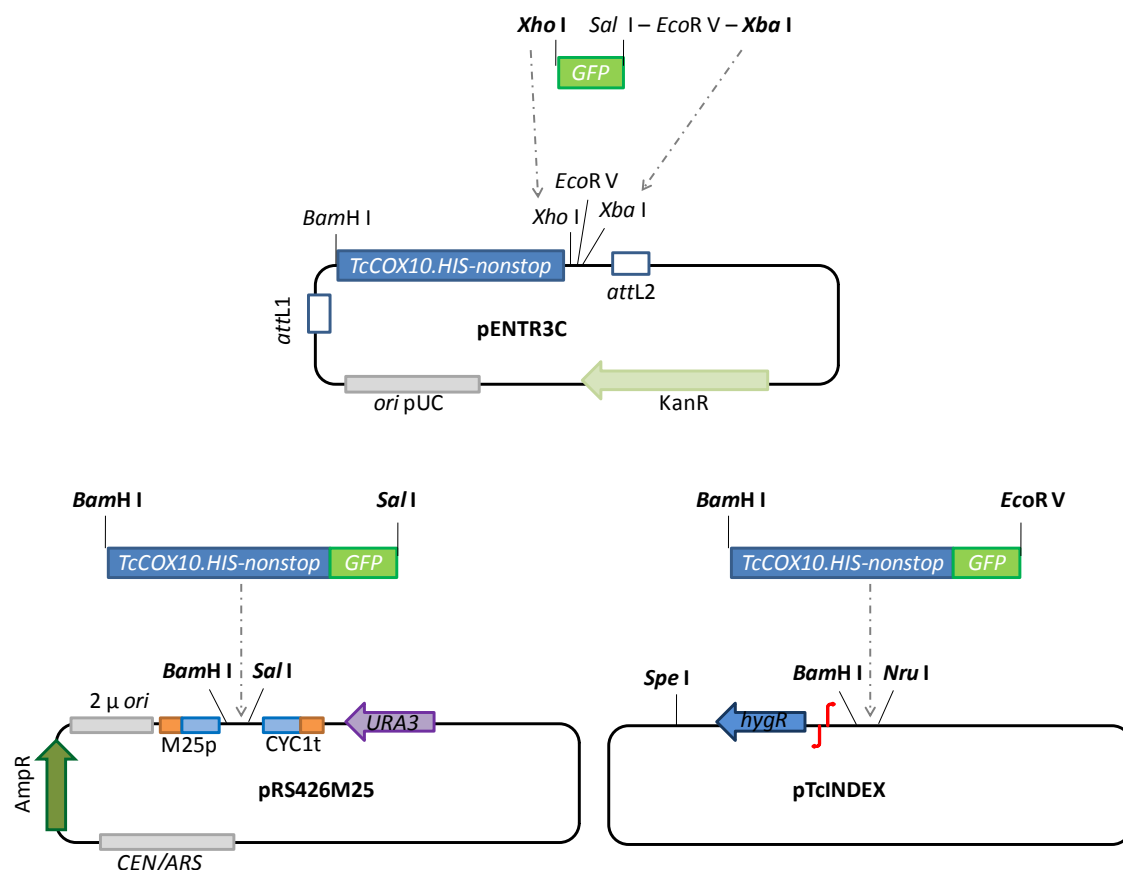


Figura 36. Estrategia de clonado para *TcCOX10.HIS-GFP*. En la parte superior, se muestra la estrategia de generación de la secuencia *TcCOX10.HIS-GFP* en el vector pENTR3C y su posterior clonado a los vectores pRS426M25 para su expresión en levaduras y pTcINDEX para su expresión en *T. cruzi*.

V.2.2.2 Análisis de la expresión de TcCox10.His-GFP en *Saccharomyces cerevisiae cox10Δ*

El vector de expresión para levaduras pRS426M25.*TcCOX10.HIS-GFP* obtenido se utilizó para evaluar la función de TcCox10.His-GFP en células de *S. cerevisiae* a través de las aproximaciones experimentales que se describen a continuación.

V.2.2.2.1 Ensayos de complementación en placa en células *cox10Δ*

La expresión de la proteína de fusión TcCox10.His-GFP se evaluó en células de *S. cerevisiae cox10Δ* (DY5113 *cox10::KanMX4*), de manera similar a como se procedió previamente con TcCox10.His (y también con la proteína TcCox15.His; Merli y col., 2017). Así, estas células fueron transformadas por el método químico con el vector pRS426M25.*TcCOX10.HIS-GFP* y además, como controles, con los plásmidos pRS426M25.*ScCOX10.HIS* y pRS426M25.*TcCOX10.HIS* (sección IV.5.11). Las células transformantes fueron seleccionadas en medios sólido SCDO Glu -Ura y las colonias

obtenidas posteriormente se utilizaron para ensayos de complementación en placa donde se evaluó la capacidad de estas de crecer frente a fuentes de carbono fermentables y no fermentables. Además como el promotor *MET25* se reprime por metionina, los mismos medios se complementaron con concentraciones crecientes de Met (de 0 a 20 mg/l) de forma tal de modular la expresión del gen (Mumberg y col., 1994). También se evaluó la expresión de TcCox10.His-GFP en la cepa silvestre (DY5113) (secciones IV.7.1.1 y IV.7.1.2).

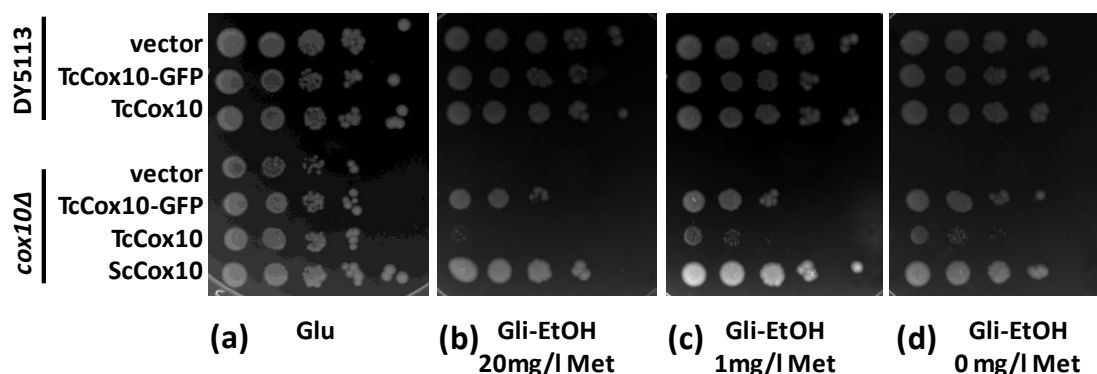


Figura 37. Actividad de TcCox10.His-GFP en *Saccharomyces cerevisiae cox10Δ* por ensayos de complementación en placa. Se utilizaron células de *S. cerevisiae cox10Δ* transformadas con pRS426M25 (vector), pRS426M25.ScCOX10.HIS (ScCox10), pRS426M25.TcCOX10.HIS (TcCox10) y pRS426M25.TcCOX10.HIS-GFP (TcCox10-GFP) en la mitad inferior de la figura. En la mitad superior se muestra el control realizado con la cepa salvaje (DY5113). Se sembraron 7 μ L de diluciones seriadas al 1/10 desde una dilución inicial de $DO^{600} = 1$ de cada cultivo en medio sólido SCDO -Ura. **(a)** Crecimiento empleando una fuente de carbono fermentable (Glu). **(b), (c) y (d)** Ensayo de la capacidad respiratoria empleando una fuente de carbono no fermentable (Gli-EtOH) con distintas cantidades de metionina (Met).

No se observó ninguna diferencia en el crecimiento de las células DY5113 salvajes cuando se expresaron las distintas versiones de las proteínas recombinantes de *T. cruzi* (Figura 37). En la misma figura se observa que las mutantes *cox10Δ* transformadas con el vector control mantienen su deficiencia respiratoria y sólo crecen en Glu. La expresión en *trans* del gen recombinante ScCOX10.HIS, permitió la recuperación del fenotipo salvaje en todas las condiciones ensayadas. En cambio, la expresión de TcCOX10.HIS permitió la recuperación de la deficiencia respiratoria cuando la concentración de Met agregada fue de 1 mg/ml (menor concentración ensayada) o sin el agregado. Estos resultados permiten proponer que se necesita una mayor inducción de TcCox10 para recuperar la capacidad de respirar respecto a ScCox10. Las razones postuladas que podrían justificar la diferencia observada en la complementación con ScCox10.His y TcCox10.His son las siguientes: (1) que la

importación de TcCox10 a las mitocondrias de células de levadura podría ser menos efectiva que la de ScCox10; (2) que la proteína de *T. cruzi* sería menos estable que la de *S. cerevisiae* en este organismo modelo y por ende se acumularía en menor cantidad; (3) que el plegamiento de TcCox10 podría ser diferente en *S. cerevisiae* dando como resultado una proteína menos eficiente; (4) que el ensamblado de TcCox10 sería distinto al de ScCox10; (5) o bien que ScCox10 podría cumplir otro rol esencial en la levadura además de la actividad HOS y TcCox10 sería menos eficiente en este rol. Estos resultados coinciden con lo obtenido en ensayos previos realizados en el laboratorio. Llamativamente, la expresión de *TcCOX10.HIS-GFP* produjo la reversión del fenotipo en todas las condiciones ensayadas. Las células *cox10Δ* que expresan TcCox10.His-GFP forman colonias de mayor tamaño en las condiciones restrictivas a altas concentraciones de Met, de manera similar a las que expresan ScCox10.His. Estos resultados podrían atribuirse a la porción GFP ubicada en posición C-terminal que, de alguna manera, estaría teniendo un efecto favorable sobre la proteína de *T. cruzi*, que nos propusimos estudiar.

Durante el trabajo de Tesis doctoral del Dr. Marcelo L. Merli se realizaron experimentos similares con TcCox15.His-GFP. En este caso la presencia de la porción GFP en C-terminal afectó negativamente la actividad HAS de TcCox15, ya que las células de *S. cerevisiae cox15Δ* transformadas con pRS426M25.*TcCOX15.HIS-GFP* no fueron capaces de revertir la deficiencia respiratoria a diferencia de pRS426M25.*TcCOX15.HIS*. Asimismo, la expresión de TcCox15.His-GFP en células silvestres afectó negativamente su crecimiento (Merli y col., 2017). Se postuló que la adición de la porción GFP en el extremo C-terminal de TcCox15, más voluminosa que la cola de 6 histidinas, estaría impidiendo la interacción con los diferentes intermediarios del ensamblado de la CcO o la formación de los propios oligómeros de TcCox15, afectando la actividad HAS de la enzima o la canalización del hemo A al complejo CcO.

V.2.2.2.2 Evaluación del consumo de oxígeno en células *cox10Δ*

De forma complementaria se realizaron medidas de consumo de oxígeno (sección IV.7.2) en las mismas células ensayadas en el apartado anterior. Esta técnica ha mostrado en algunos casos ser más sensible que el ensayo de complementación en placa ya que permite detectar si hay actividad respiratoria aun cuando ésta no sea

suficiente para el crecimiento. Para ello, células *cox10Δ* transformadas con pRS426M25 o pRS426M25 conteniendo la secuencia de ScCox10.His, TcCox10.His o TcCox10.His-GFP fueron crecidas en cultivo líquido O.N. con medio sintético SCDO Glu y Met 10 mg/ml. Como control se utilizaron células silvestres (cepa DY5113). Al día siguiente las células fueron colectadas, lavadas y suspendidas en glicerol 3 %, tras lo cual se colocaron en oxígrafo donde se determinó la variación de porcentaje (%) de O₂ en función del tiempo (en nmol/min) (Zee y Glerum, 2006). En la Figura 38 se muestra el consumo de O₂ normalizada por la DO a 600 nm de cada cultivo ensayado, en nmol/min ml. Se observó que las células transformadas con el vector control no mostraron consumo detectable, mientras que las que expresaban ScCox10.His presentaron un mayor consumo de oxígeno que las que expresaban las proteínas de *T. cruzi*, como era de esperar según los resultados de complementación en placa. Sorprendentemente, no observamos diferencia significativa entre el consumo de O₂ de células con TcCox10.His-GFP y con TcCox10.His en este ensayo.

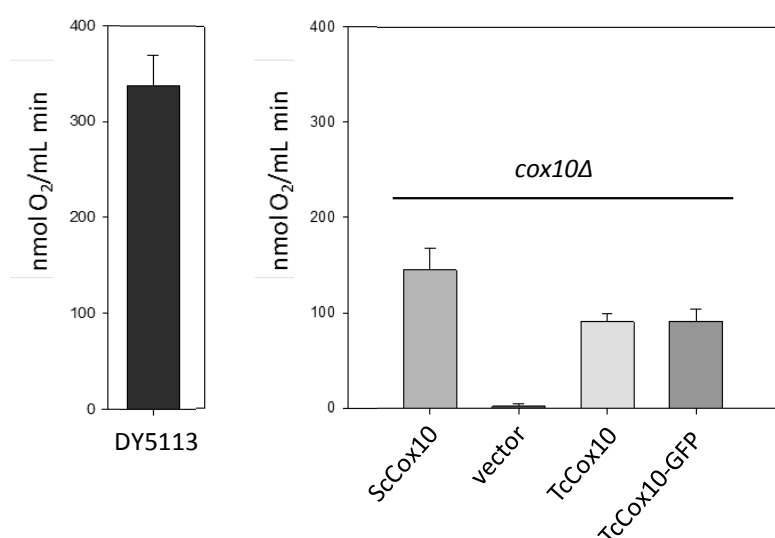


Figura 38. Evaluación del consumo de oxígeno en glicerol 3 % de *Saccharomyces cerevisiae cox10Δ*. Las medidas se llevaron a cabo en células *cox10Δ* transformadas con pRS426M25 (vector), pRS426M25.ScCOX10.HIS (ScCox10), pRS426M25.TcCOX10.HIS (TcCox10) y pRS426M25.TcCOX10.HIS-GFP (TcCox10-GFP) y la cepa silvestre DY5113 como control, incubadas en glicerol 3 %. Los datos son expresados como el promedio \pm DS de 3 agregados medidos del mismo preparado celular.

Los resultados obtenidos al expresar en *trans* los genes *COX10* de *T. cruzi*, pueden deberse a varias razones, que se comentan a continuación: (a) TcCox10.His-GFP es más eficiente en su actividad HOS (y por ende, la tasa de respiración es mayor) pero las mediciones no se realizan durante un período de tiempo suficiente para ver

esa diferencia (como sí ocurre en el test de complementación en el que se incubaba en placa al menos 7 días); (b) TcCox10.His-GFP y TcCox10.His son igualmente eficientes y la diferencia en crecimiento en placa se debe a que la primera tiene alguna otra ventaja sobre el crecimiento no directamente relacionada con el consumo de O₂; (c) independientemente de si TcCox10.His-GFP es más o menos eficiente en su actividad HOS necesaria para la respiración celular, las células se crecieron sin presión de selección (medio con Glu) y por ende, la cantidad sintetizada de estas proteínas por célula es variable en cada cultivo y entre los distintos cultivos al momento de realizar las mediciones. Además, al normalizar el consumo de O₂ por una DO⁶⁰⁰ total no se discrimina aquellas células vivas de las no viables. En la complementación en placa en cambio, el efecto del medio selectivo (Gli-EtOH) se mantiene durante varios días en los que las células se multiplican y como resultado se observan células vivas que expresaron la proteína de estudio. Posiblemente, la incubación de las células en un medio selectivo (Gli-EtOH) por un período más prolongado, previo a las mediciones del consumo de O₂, asimilaría las condiciones de ambos ensayos y otorgaría resultados más precisos.

Durante el trabajo de Tesis doctoral del Dr. M. L. Merli se ha construido y expresado la proteína recombinante TcCox15.His-GFP y se ha observado que, a diferencia de lo que ocurre con TcCox10.His-GFP, al expresar *TcCOX15.HIS-GFP* en células de *S. cerevisiae cox15Δ*, el consumo de oxígeno fue un 20 % en relación al consumo de las levaduras que expresan *TcCOX15.HIS* (Merli y col., 2017).

V.2.2.2.3 Detección de TcCox10.His y TcCox10.His-GFP en extractos crudos mitocondriales.

Para evaluar la localización mitocondrial propuesta para TcCox10.His y TcCox10.His-GFP se realizaron ensayos de Western blot sobre fracciones mitocondriales crudas de células *cox10Δ* que expresan TcCox10.His y TcCox10.His-GFP. Para ello se estudiaron las mismas cepas que las utilizadas en los test de complementación y de respiración. Las mismas se cultivaron O.N. a 30 °C en SCDO Gal-Ura y con Met 1 mg/ml en volúmenes de 200 ml hasta alcanzar una DO⁶⁰⁰ comprendida entre 7 y 9, tras lo cual se procesaron para obtener extractos crudos mitocondriales según el protocolo adaptado de Diekert y colaboradores (sección

IV.6.6). Brevemente, las células se colectaron y lavaron con H_2O_d , tras lo cual se colocaron en suspensión en una solución tampón SHP fría junto con esferas de vidrio estériles de 0,4 - 0,5 mm de diámetro. La agitación vigorosa con *vortex* provoca la ruptura mecánica de las células, cuyo contenido se recuperó en fracciones por centrifugación a velocidades crecientes (600 x *g*, 1200 x *g*, 16100 x *g*). Los pellets obtenidos a la mayor velocidad contienen las mitocondrias; los mismos se colocaron en suspensión en un pequeño volumen de solución SHP y posteriormente se ensayaron por Western blot. Se utilizaron anticuerpos específicos anti-TcCox10 policlonales, anti-His y anti-GFP, según corresponda (sección IV.6.3). Los resultados se muestran en la Figura 39, donde se observan bandas de pesos moleculares que corresponderían a las respectivas proteínas recombinantes: 48 kDa y 36 kDa, respectivamente para ScCox10.His y TcCox10.His. Es importante destacar que el patrón de bandas observado en las muestras de ScCox10.His y TcCox10.His, se ha obtenido previamente en el laboratorio. Para TcCox10.His-GFP sólo se detecta una banda del tamaño correspondiente al de la proteína fusión (75 kDa) al utilizar los anticuerpos anti-GFP, cuando se utilizan los anticuerpos anti-His no se ha obtenido señal y con los anti-TcCox10 se observa una banda muy tenue de aproximadamente 75 kDa y una muy intensa de aproximadamente 30 kDa, posiblemente sea el producto de una proteólisis que genera fragmentos de tamaño definido a partir de TcCox10.His-GFP.

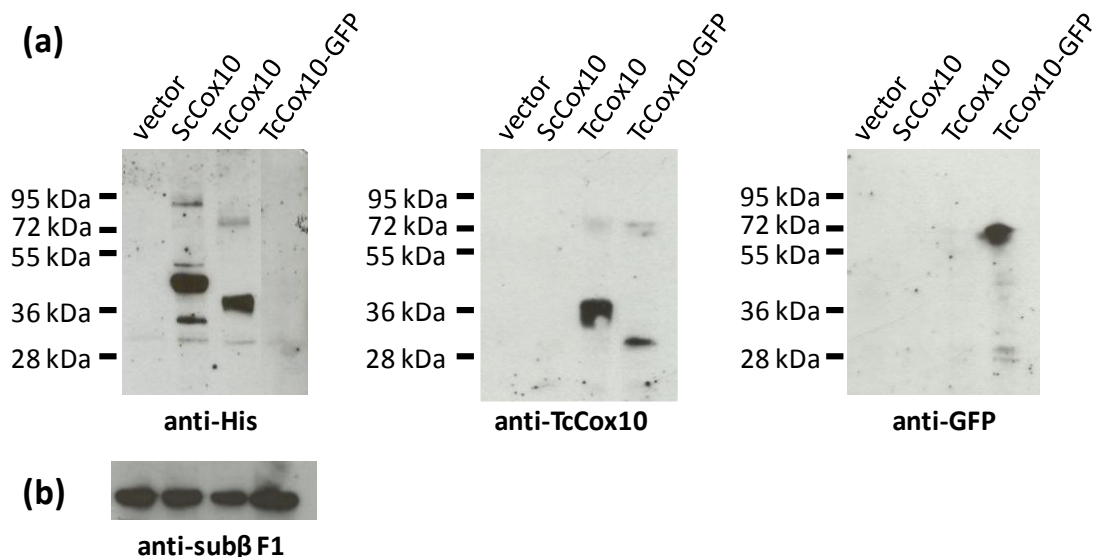


Figura 39. Detección de las proteínas Cox10.His de *Saccharomyces cerevisiae* (ScCox10) y de *Trypanosoma cruzi*, con (TcCox10-GFP) y sin (TcCox10) fusión a GFP, en extractos crudos mitocondriales de *S. cerevisiae cox10Δ* transformantes mediante Western blot. **(a)** utilizando los anticuerpos que se describen bajo cada membrana. **(b)** Control de carga proteica de una de las membranas utilizando anticuerpos anti-subunidad β de la proteína F1 de la ATPasa mitocondrial.

En la Figura 40 se muestra un patrón de bandas típico al revelar extractos mitocondriales similares. Es común observar una banda intensa de aproximadamente 36 kDa y una tenue de 80 kDa para la proteína recombinante TcCox10.His, tanto con los anticuerpos anti-TcCox10 como con los anti-His (si bien la masa esperada para TcCox10 es de 43 kDa, estimado a partir de la secuencia de aminoácidos completa) y varias bandas para la proteína recombinante ScCox10.His, con una más intensa a 42 kDa al utilizar el anticuerpo anti-His (si bien el peso esperado para ScCox10 es de 52 kDa), ensayadas en las mismas condiciones. La diferencia entre la masa real de la proteína y la que se observa en la migración en el gel podría deberse a que las enzimas Cox10 son proteínas de membrana y, como tales, presentan un perfil de migración diferente al de proteínas globulares solubles.

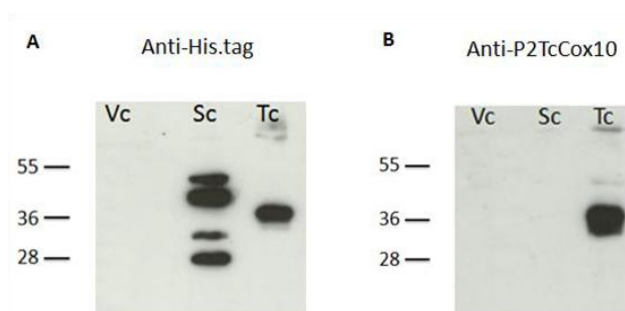


Figura 40. Detección de las proteínas ScCox10.His y TcCox10.His en las fracciones mitocondriales totales de *Saccharomyces cerevisiae cox10Δ* transformantes mediante Western blot. A- Western blot utilizando anticuerpos anti-His. B- utilizando los anticuerpos anti-TcCox10. Vc: *cox10Δ* + pRS426M25, Sc: *cox10Δ* + pRS426M25.ScCOX10.HIS y Tc: *cox10Δ* + pRS426M25.TcCOX10.HIS.

Figura tomada de la Tesina de grado de Lucía V. Ferrero, titulada "Estudio estructural y funcional de la enzima Hemo O Sintasa de *Trypanosoma cruzi*". Directora: Dra. Julia A. Cricco.

V.2.2.2.4 Orientación de las HOS en membrana mitocondrial de levadura

Una posible explicación a la observación descrita en el apartado V.2.2.2.1 podría deberse a la existencia de diferencias en la topología de ScCox10.His, TcCox10.His y TcCox10.His-GFP en la membrana mitocondrial de levaduras, de manera que se afecte sus respectivas actividades de HOS o su interacción con otras proteínas de la biosíntesis de hemo A. Para dilucidar estas hipótesis, nos propusimos analizar la orientación del extremo C-terminal de estas proteínas mediante ensayos de protección a la digestión proteolítica en fracciones mitocondriales. Para ello se siguió el protocolo descrito por Boldogh y Pon (2007) en el cual mitocondrias intactas, mitocondrias desprovistas de membrana externa y mitocondrias totalmente disgregadas son tratadas con Proteinasa K (Figura 41, parte superior). La sensibilidad de estas preparaciones a la proteasa dependerá de qué regiones de las proteínas recombinantes estén expuestas y de la integridad de las membranas mitocondriales,

en cada condición (sección IV.6.7; Boldogh y Pon, 2007). A través de la detección de las etiquetas en C-terminal mediante Western blot usando anticuerpos específicos, podrá detectarse la presencia o no de esta región, y por ende su orientación respecto a cada membrana mitocondrial. En la parte inferior de la Figura 41 se detalla el patrón esperado para la actividad de la proteasa según a qué compartimento mitocondrial esté orientada la etiqueta a detectar.

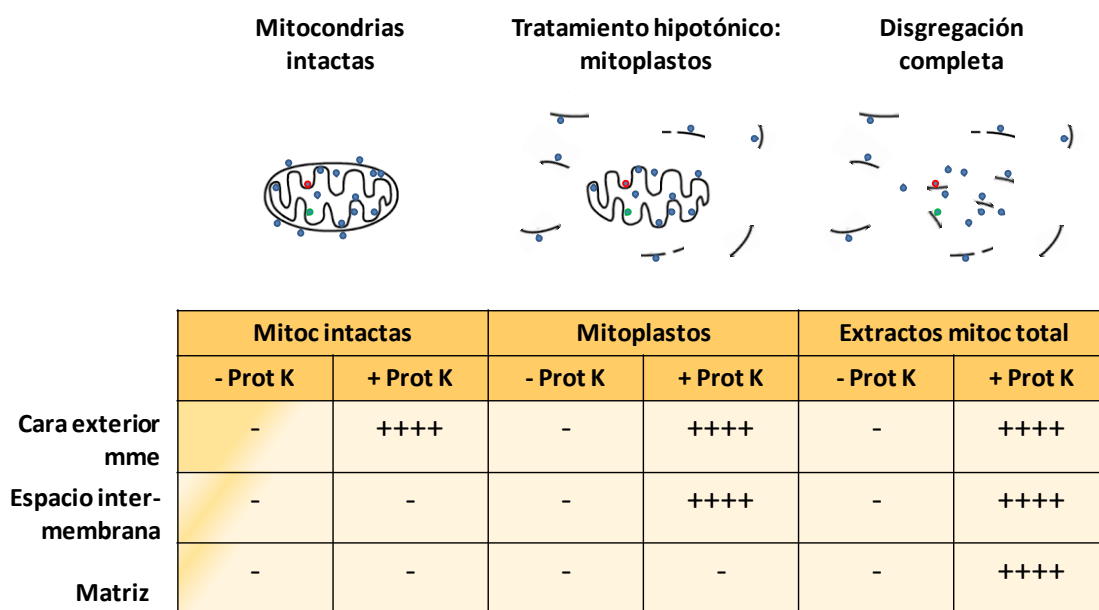


Figura 41. Esquema de un ensayo de digestión proteolítica de extractos mitocondriales y submitocondriales de levadura. En la parte superior se muestra esquemáticamente las condiciones en que las mitocondrias son sometidas al tratamiento con proteasa. Abajo, patrón esperado para el análisis por Western blot de proteínas con porciones sensibles a proteinasa K localizados hacia el exterior de la membrana externa, hacia el espacio intermembrana o hacia la matriz. Las +++ indican sensibilidad a la proteasa por lo que se espera la desaparición de señal de dicha porción en un Western blot. mme, membrana mitocondrial externa.

Durante el transcurso de este trabajo de Tesis, se sometieron al tratamiento anterior extractos mitocondriales de levaduras *cox10Δ* transformantes expresando ScCox10.His, TcCox10.His o TcCox10.His-GFP. El posterior análisis por Western blot reveló que no se lograron optimizar las condiciones de este ensayo a pesar de los repetidos intentos.

V.2.2.2.5 Detección de TcCox10.His-GFP por microscopía de fluorescencia

Se estudió la presencia de TcCox10.His-GFP en levaduras mediante microscopía confocal de fluorescencia. Para ello, células de *S. cerevisiae cox10Δ* expresando la proteína TcCox10.His-GFP fueron crecidas en medios suplementados con distintas fuentes de carbono, Glu, Gal y Gli-EtOH y se procesaron según el protocolo de sección

IV.8.1. En la Figura 42 se muestran imágenes representativas de los diferentes ensayos independientes realizados. La señal fluorescente verde correspondiente a la proteína fusión TcCox10.His-GFP mostró un patrón que apoyaría una localización en organelas subcelulares, probablemente mitocondrias. Este patrón permite descartar su posible localización en el núcleo o en la membrana plasmática. Por otro lado, en todas las condiciones de crecimiento ensayadas, la señal correspondiente a la fluorescencia de GFP sólo se aprecia en un bajo porcentaje de las células, siendo las células crecidas en Gli-EtOH las que presentaron mayor porcentaje de células con señal fluorescente verde. Se realizaron numerosos ensayos de marcación con MitoTracker de estas células pero éstos no dieron resultados que permitan confirmar ni descartar la superposición de señal fluorescente verde y señal roja que se esperaría para una localización mitocondrial de esta proteína recombinante. Si bien, la recuperación de la capacidad respiratoria que se observó en los ensayos de crecimiento en placa y consumo de O₂ necesitan de una localización en mitocondria de la HOS, la expresión de una GFP mitocondrial presenta una fluorescencia característica en organelas de morfología que no se asemeja a nuestras observaciones. En la Figura 43 se muestra un patrón típico de las mitocondrias de levaduras transformadas con pYX142-*mtGFP* (Westermann y Neupert, 2000), un vector que expresa la GFP unida en su N-terminal a un péptido señal de direccionamiento mitocondrial (trabajo realizado por Marcelo L. Merli durante su Tesis doctoral). También están reportados varios trabajos, como el de Visser y colaboradores donde se muestra que la morfología de las mitocondrias de levadura es de tipo globular ramificada, con mayor o menor número de ramificaciones según la fuente de carbono (Visser y col., 1995). En cambio, la mayoría de las células observadas en nuestros preparados no muestran un patrón de señal típico de mitocondria si se la compara con estos patrones de señal mitocondrial de levaduras.

A raíz de estas observaciones, se puede postular que la cantidad de TcCox10.His-GFP que localiza en mitocondria sea mínima y una localización alternativa bien podría ser consecuencia de su sobreexpresión. Esto explicaría la dificultad para detectar la proteína fusión por Western blot de extractos mitocondriales con algunos anticuerpos. Además, si gran parte de la proteína de fusión sufriese proteólisis, explicaría la ausencia de señal en Western blot así como la fluorescencia observada en un bajo porcentaje de células transformantes. Respecto a este último caso, puede que

sufriese proteólisis sólo la fracción de proteína que va a mitocondria, mientras que la proteína de fusión en vesículas quedase intacta, lo cual explicaría la fluorescencia en vesículas y en pocas células o, alternatively, que gran parte de la proteína sea direccionada a mitocondria y sea parcialmente degradada tal que la porción con GFP quede fuera de la misma, en vesículas.

Figura 42. Imágenes de microscopio confocal de células de *Saccharomyces cerevisiae* *cox10Δ* expresando TcCox10.His-GFP crecidas en medio de cultivo sintético y utilizando diferentes fuentes de carbono: fermentable (Glu o Gal) y no fermentable (Gli-EtOH).

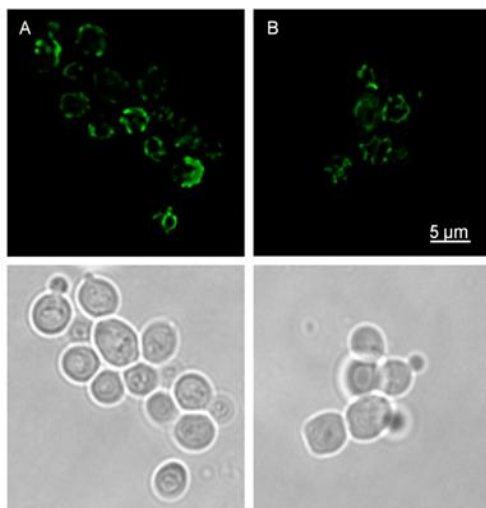
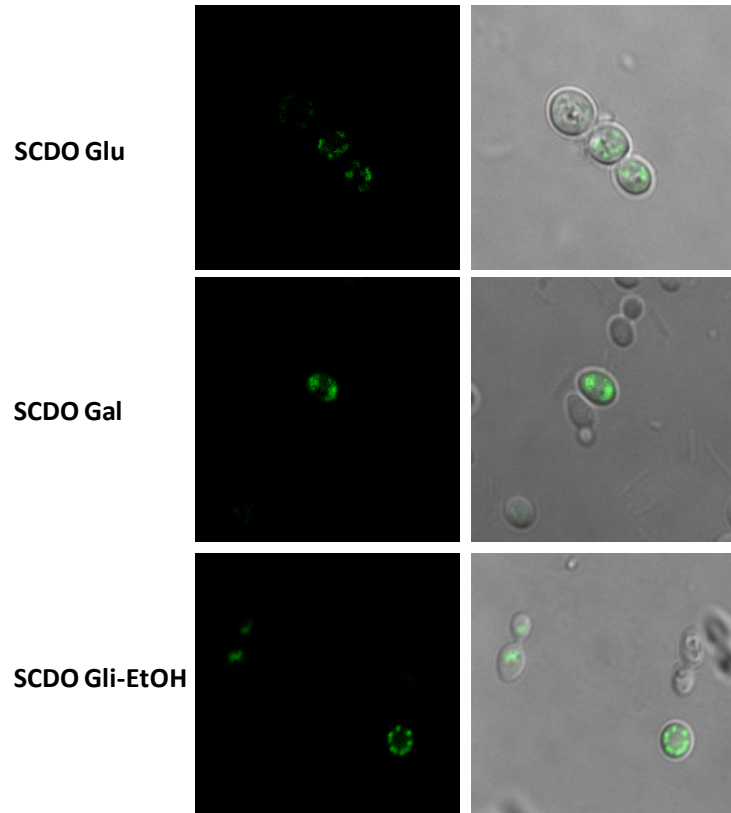


Figura 43. Mitocondrias de levadura marcadas con GFP. Imágenes deconvolucionadas de microscopía de fluorescencia de células de *S. cerevisiae* silvestres transformadas con pYX142-*mtGFP* crecidas O.N. en medio SCDO -Leu y utilizando diferentes fuentes de carbono: Glu (A) y Gli-EtOH (B). Las imágenes son representativas de diferentes campos tomados de dos experimentos independientes. Si bien en nuestras muestras no se logra apreciar una diferencia apreciable entre las mitocondrias de levaduras crecidas en medio fermentable y no fermentable, está reportado que al crecer en etanol las levaduras tienen mayor número de mitocondrias (20–30) de menor tamaño y redondeadas en relación a cuando crecen en Glu (Visser y col., 1995). Figura tomada del trabajo de Tesis del Dr. M. L. Merli.

V.2.2.3 Modelo propuesto para explicar la actividad de TcCox10 en *Saccharomyces cerevisiae*

A raíz de lo observado por la complementación en placa se formuló una hipótesis que considera que la fusión a GFP tendría un efecto positivo sobre la actividad HOS de TcCox10, posiblemente porque afecte su plegamiento, su estabilidad, su incorporación a la mitocondria, su actividad catalítica o incluso su orientación en la membrana. Tratando de encontrar una posible justificación al fenotipo observado, y como hasta la fecha no hay estructura resuelta de ninguna de estas proteínas, analizamos la posible topología de ScCox10 y TcCox10 utilizando métodos bioinformáticos de uso libre (descritos en sección IV.1.2), ya que estudiar estos aspectos sería un avance importante en la caracterización de la proteína TcCox10. En la Tabla V se representan las probables regiones de hélice transmembrana (TMD) predichas para las distintas proteínas Cox10 según los métodos utilizados.

Tabla V. Predicciones de hélices transmembrana de las HOS de *Saccharomyces cerevisiae* y *Trypanosoma cruzi*

| Organismo | TMHMM | Phobius | HMMTOP | TMpred |
|----------------------|----------------------|----------|-----------|----------|
| <i>S. cerevisiae</i> | 4^a | 7 | 9 | 9 |
| <i>T. cruzi</i> | 7^b | 9 | 10 | 8 |

a. Tiene 7 regiones de hélices de membrana, pero 3 de ellas tiene baja probabilidad según este programa predictor.

b. Tiene una señal débil extra, que no es considerada TMD por este programa, pero si por el HMMTOP.

Si bien existen discrepancias en la predicción del número de TMD de las Cox10 con los distintos algoritmos, consideramos que es altamente probable que ScCox10 presente un número impar de segmentos TMD, mientras que para TcCox10 es más probable que posea un número par de estos segmentos (posiblemente 8). Además se predice que el extremo N-terminal de ambas proteínas se encuentra expuesto hacia el citosol. En conjunto, esto podría determinar que los residuos catalíticos estén localizados en una y otra proteína en compartimentos subcelulares distintos cuando se expresan en *S. cerevisiae*. Si la fusión a GFP alterase la conformación de TcCox10.His de forma tal que los aminoácidos necesarios para la actividad se orienten favorablemente, entonces explicaría la diferencia en la complementación observada

entre las proteínas de *T. cruzi* y la de *S. cerevisiae*. En la Figura 44 se muestra una representación de las proteínas Cox10 según lo planteado.

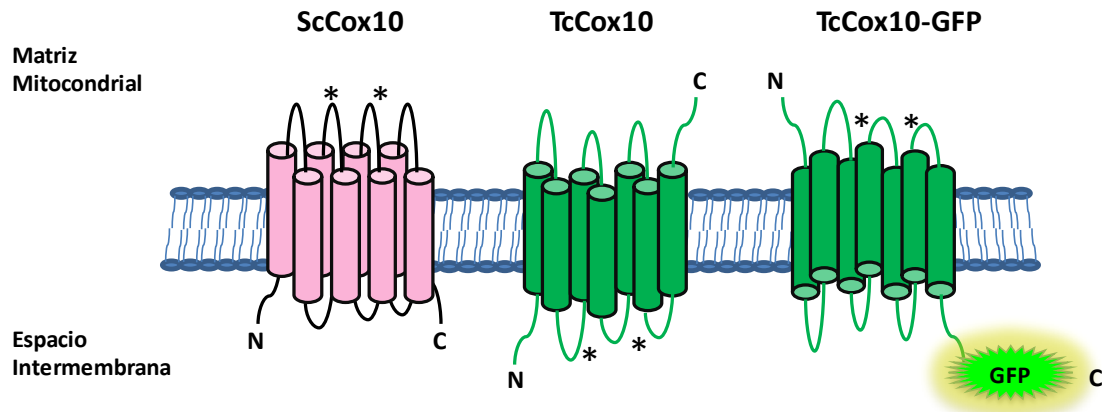


Figura 44. Esquema de la topología probable para ScCox10.His, TcCox10.His y TcCox10.His-GFP cuando se expresan en *Saccharomyces cerevisiae*.

Por otro lado, para comprobar esta hipótesis (diferente orientación) se ha intentado determinar la orientación del extremo C-terminal de ScCox10.His, TcCox10.His y TcCox10.His-GFP mediante digestión de fracciones mitocondriales con Proteinasa K (sección V.2.2.2.4) que, como se comentó, no se logró optimizar el protocolo del ensayo. Este resultado hubiese constituido un aporte al conocimiento de la estructura que adopten estas proteínas embebidas en la membrana mitocondrial. Sin embargo, podemos hipotetizar que una diferente orientación de residuos responsables de actividad HOS en ScCox10 y TcCox10 podrían responder a diferentes caminos de llegada del hemo a estas enzimas en sus organismos nativos. En el esquema de la Figura 45 representamos nuestra propuesta.

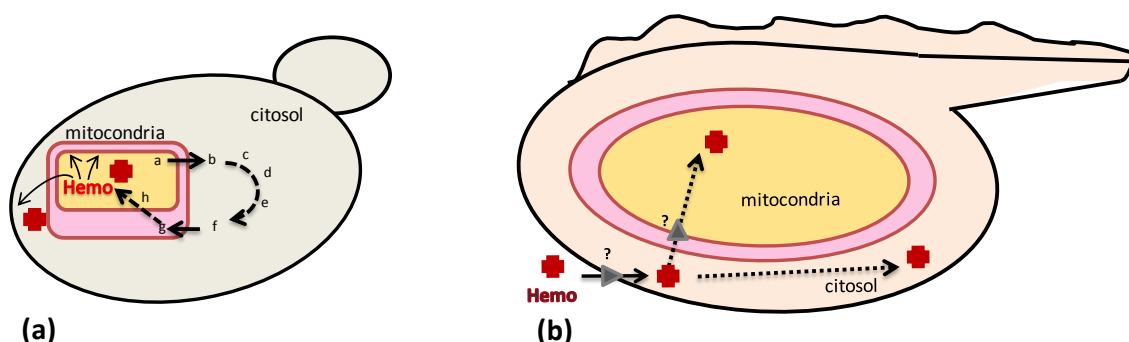


Figura 45. Esquema de la ruta propuesta del hemo en *Saccharomyces cerevisiae* (a) y en *Trypanosoma cruzi* (b). Dado que *S. cerevisiae* sintetiza hemo en la matriz mitocondrial, el cofactor llega a ScCox10 directamente desde allí. En cambio, *T. cruzi* lo capta del exterior y debe transportarlo hasta la mitocondria. Entonces TcCox10 podría recibir el hemo desde 2 direcciones opuestas, la matriz mitocondrial o el espacio intermembrana. a-h son intermediarios de la biosíntesis de hemo, los triángulos grises representan un posible transportador de membrana para el cofactor.

V.2.2.4 Localización subcelular de TcCox10 en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

El análisis de las imágenes previamente obtenidas mediante la técnica de IFI en epimastigotes de *T. cruzi*, utilizando anticuerpos específicos anti-TcCox10 para detectar la proteína endógena y MitoTracker, mostraron que la señal correspondiente a TcCox10 no se superponía con la de este marcador mitocondrial. Para verificar este resultado, que indicaría una localización no mitocondrial de TcCox10 decidimos determinar la localización de la versión recombinante con fusión a GFP.

Para ello, los epimastigotes de *T. cruzi* Dm28c pLEW13 fueron transfectados por electroporación con los vectores pTcINDEX, pTcINDEX.TcCOX10.HIS-GFP y pTcINDEX.TcCOX10.HIS (secciones IV.2.1 y IV.5.12). Una vez obtenidos los transfectantes estables por selección con Hyg (30-45 días), se indujo la expresión de las proteínas recombinantes mediante el agregado de Tet 0,25 µg/ml durante 48 h. Estos parásitos fueron utilizados para confirmar la presencia de las proteínas recombinantes por ensayos de Western blot y determinar su localización en fraccionamiento celular y en ensayos de IFI.

V.2.2.4.1 Detección de TcCox10.His y TcCox10.His-GFP en extractos totales

En primer lugar, los parásitos transfectantes que fueran inducidos se colectaron y procesaron para obtener extractos celulares totales (sección IV.6.8). Los mismos luego se utilizaron para confirmar la presencia de las proteínas recombinantes por ensayos de Western blot. En la Figura 46 se muestra el resultado obtenido al utilizar anticuerpos anti-TcCox10; las bandas detectadas se corresponden con las siguientes masas moleculares: 36 kDa para TcCox10.His y 72 kDa para TcCox10.His-GFP.

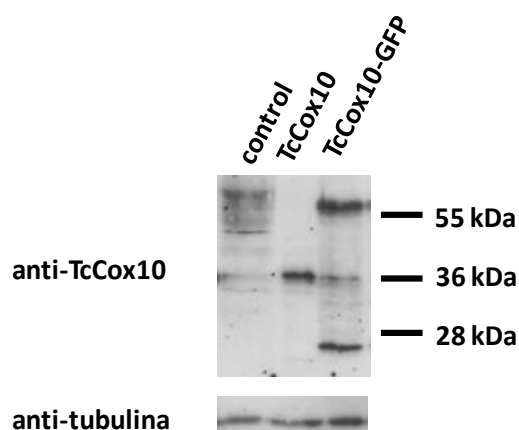


Figura 46. Las proteínas TcCox10.His y TcCox10.His-GFP se expresan en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* Dm28c. Ensayo de Western blot con anticuerpos anti-TcCox10 sobre extractos totales de *T. cruzi* Dm28c pLEW13 transfectados con pTcINDEX.TcCOX10.HIS y pTcINDEX.TcCOX10.HIS-GFP luego de 48 h de inducción (Tet 0,25 µg/ml). En la parte inferior se muestra el control de carga proteica con un anticuerpo específico para tubulina.

En la calle correspondiente a TcCox10.His-GFP, se observa también la presencia de una banda que correspondería a una proteína de alrededor 30 kDa, de la misma manera que se observó en extractos mitocondriales de *S. cerevisiae*. Posiblemente, TcCox10.His-GFP posea un sitio lábil, de fácil proteólisis, que provoque que la proteína de fusión se escinda dando un producto de degradación de tamaño definido. Esto justificaría la observación de una señal de menor masa molecular en los ensayos realizados a partir de extractos totales de levaduras transformantes como en parásitos transfectantes.

V.2.2.4.2 Detección de TcCox10 en fracciones subcelulares

Para determinar la localización intracelular de TcCox10 –tanto la proteína endógena como las formas recombinantes- en *T. cruzi* se procedió a la optimización de un protocolo de extracción y fraccionamiento de proteínas totales por centrifugación diferencial (Morales y col., 2009). Una vez puesto a punto, el paso siguiente consistiría en su aplicación a parásitos transfectantes expresando las formas recombinantes de TcCox10 y de mtTcAbcB así como también a la cepa salvaje, para determinar la localización subcelular de las proteínas de interés. El proceso consiste en romper la membrana de epimastigotes de *T. cruzi* con mortero en presencia de un abrasivo y obtener un extracto total, el cual luego se somete a un número de centrifugaciones consecutivas a velocidades crecientes (sección IV.6.9). Se obtuvieron fracciones de extracto total y de pellets y sobrenadantes a cada velocidad aplicada (100 x *g* a 50.000 x *g*). Se esperaba obtener un enriquecimiento en las distintas fracciones subcelulares de aquellas proteínas de organelas específicas, las cuales debían sedimentar a las distintas velocidades de centrifugación. Estas fracciones fueron analizadas por Western blot utilizando anticuerpos específicos para distintos marcadores (proteínas de localización subcelular conocida) de cada organela y para las proteínas bajo estudio, que esperábamos localicen junto con marcadores mitocondriales. Los anticuerpos utilizados fueron específicos para peroxidasa mitocondrial (TcmPx), tirosina aminotransferasa (TAT) citosólica, glucoquinasa (TcGLCK) glicosomal, ascorbato peroxidasa (TcAPx) de RE y proteínas bajo estudio (mtTcAbcB, TcCox15, TcCox10). Un esquema de lo esperado se muestra en la Figura 47. A pesar de que se ensayó este protocolo con cultivos de parásitos de cepa silvestre (Dm28c) en numerosas ocasiones,

en ninguna de ellas el patrón de marcadores obtenido fue reproducible ni coincidente con el esperado; lo mismo sucedió al analizar las proteínas bajo estudio. Una vez optimizada la técnica, se planeaba repetir el procedimiento con parásitos transfectantes que sobreexpresaran TcCox10.His o TcCox10.His-GFP.

| | | 100 x g | 600 x g | | 1.000 x g | | 5.000 x g | | 13.500 x g | | 25.000 x g | | 48.500 x g | |
|------|-----|------------|---------|-----|-----------|-----|-----------|-----|------------|-----|------------|-----|------------|-----|
| | ExT | SN0 | P1 | SN1 | P2 | SN2 | P3 | SN3 | P4 | SN4 | P5 | SN5 | P6 | SN6 |
| Cit | + | + | | + | | + | | + | | + | | + | | + |
| MP | + | + | + | | + | | | | | | | | | |
| RE | + | + | | + | | + | | + | | + | +++ | | | |
| Glic | + | + | | + | | + | | + | | | +++ | | | |
| Mit | + | + | | + | | + | ++ | | +++ | | | | | |
| AC | + | + | | + | | + | | + | | + | | + | +++ | |

Figura 47. Fraccionamiento subcelular de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* por centrifugación diferencial. Esquema esperado para el análisis por Western blot de las fracciones extracto total inicial (ExT), pellet (P) y sobrenadante (SN) obtenidas luego de centrifugar extractos de *T. cruzi* a velocidades crecientes (100, 600, 1000, 5000, 13500, 25000 y 48500 x g). Los componentes subcelulares que se esperan obtener en las distintas fracciones son: citosol (Cit), membrana plasmática (MP), retículo endoplasmático (RE), glicosomas (Glic), mitocondrias (Mit) y ácidocalcisomas (AC).

Dado que en el tiempo en que se llevó a cabo el presente trabajo de Tesis no fue posible determinar las condiciones experimentales para fraccionar componentes subcelulares de epimastigotes de *T. cruzi*, el procedimiento en cuestión no pudo ser aplicado a los transfectantes obtenidos.

V.2.2.4.3 Detección de TcCox10.His-GFP por microscopía de fluorescencia

Como método adicional para determinar la localización intracelular de la HOS de *T. cruzi*, se utilizó la técnica de microscopía de fluorescencia. Así, aquellos parásitos transfectantes que expresaban la proteína recombinante TcCox10.His-GFP, fueron procesados para su visualización por microscopía confocal con tinción mitocondrial (sección IV.8.2) (Figura 48). En este caso, se observó una superposición de la señal fluorescente verde (GFP) con la roja debida al marcador mitocondrial utilizado (MitoTracker) en el preparado de la muestra. Esto demuestra que TcCox10.His-GFP efectivamente localiza en mitocondria de epimastigotes de *T. cruzi*. Los controles correspondientes utilizando anticuerpos específicos para TcCox10 y para la etiqueta de histidinas no permitieron detectar la proteína fusión por la técnica de IFI.

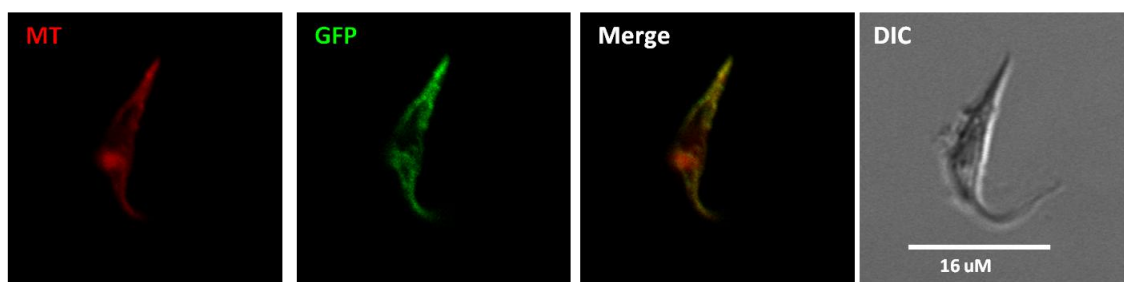


Figura 48. Localización mitocondrial de TcCox10.His-GFP en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal de epimastigotes de *T. cruzi* Dm28c pLEW13 transfectantes portando el pTcINDEX.TcCOX10.HIS-GFP luego de 48 h de inducción (Tet 0,25 μg/ml).

Los resultados no concluyentes obtenidos con anterioridad al comienzo de esta Tesis -utilizando anticuerpos anti-TcCox10 en muestras de parásitos silvestres- pueden deberse entonces a que la cantidad de TcCox10 endógena sea muy baja y por ende los anticuerpos estén reconociendo epitopes del parásito de manera inespecífica.

V.2.3 Funcionalidad de la proteína TcCox10 en *Trypanosoma cruzi*. Perspectivas

A lo largo del presente trabajo de Tesis, se realizaron numerosos eventos de transfección por electroporación y posterior proceso de selección, pero no fue posible volver a obtener transfectantes estables con las construcciones de TcCox10. Incluso en algunos casos las células transfectadas con este plásmido detuvieron su crecimiento antes de que lo hicieran las células control electroporadas en ausencia de ADN. Esta situación constituyó una pausa en los avances del estudio de TcCox10 en su organismo de origen. Algunos de los experimentos hasta aquí descriptos deben profundizarse. Asimismo, se propone realizar curvas de crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* transfectantes portando las secuencias codificantes para TcCox10.6His y TcCox10.His-GFP y evaluar el efecto de la sobreexpresión de estas proteínas. También, la funcionalidad de TcCox10.His-GFP puede evaluarse por mediciones del consumo de O₂ de parásitos transfectantes, técnica que ha sido probada en epimastigotes Dm28c en nuestro laboratorio.

Por último, se propone estudiar la interacción entre TcCox10 y otras proteínas mediante técnicas de inmunoprecipitación y geles de proteínas en condiciones nativas (Blue-Native) donde esperamos encontrar aquella responsable de cederle el hemo B y/o al transportador de hemo mitocondrial (¿tal vez mtTcAbcB?).

V.2.4 Conclusiones

Como contribución al objetivo general de este trabajo se propuso continuar con el estudio de la proteína TcCox10 de *T. cruzi*, involucrada en el metabolismo de hemo B mitocondrial. En particular se intentó corroborar su localización mitocondrial, para lo cual se generaron herramientas genéticas de trabajo. Es así que:

- ✓ se generó la secuencia recombinante que codifica para TcCox10.His-GFP, la cual se clonó en vectores apropiados para su expresión en levaduras y en epimastigotes de *T. cruzi*.

Los ensayos de complementación heteróloga en *S. cerevisiae cox10Δ* mostraron que:

- ✓ el producto proteico codificado por *TcCOX10.HIS* y el codificado por *TcCOX10.HIS-GFP* se sintetizan en levaduras y al menos parte localizan en mitocondrias.

- ✓ la proteína TcCox10.His-GFP es funcional ya que permite a las células *cox10Δ* recuperar su capacidad respiratoria. Se observan diferencias respecto a la complementación en placa con las proteínas recombinantes ScCox10.His y TcCox10.His; podría ocurrir que TcCox10.His-GFP sea más activa, más estable, esté orientada distinto que TcCox10.His. En cambio, al evaluar el consumo de O₂ no se observaron diferencias para las células expresando TcCox10.His-GFP y TcCox10.His, posiblemente por las diferencias en las condiciones experimentales de uno y otro ensayo.

- ✓ la orientación de ScCox10.His, TcCox10.His y TcCox10.His-GFP, aún no está determinada, pero podría indicar el trayecto que recorre el hemo en el interior de levaduras y de *T. cruzi*.

Por último, a pesar de las dificultades obtenidas en el presente trabajo, pudimos verificar la localización mitocondrial de la proteína recombinante TcCox10.His-GFP en *T. cruzi* y plantear un modelo de acción de TcCox10 en *S. cerevisiae* que nos permite diseñar estrategias experimentales para dilucidar las nuevas preguntas que surgen a partir del mismo

VI- Conclusiones

En el genoma de *T. cruzi* existen 28 genes pertenecientes a la familia de transportadores ABC (son 42 los presentes en el genoma de *Leishmania* y 24 en el de *T. brucei*). Su posible función ha sido asignada basándose en el conocimiento acumulado sobre genes ortólogos presentes en el genoma de otros eucariotas, como el de *Homo sapiens*, *S. cerevisiae*, *Drosophila melanogaster* o *C. elegans*. De éstos, aproximadamente la mitad codifican para proteínas cuya localización se ha asignado a organelas, de las cuales solo unos pocos serían mitocondriales (Mitsuhashi y col., 2000). A pesar de su rol clave en la homeostasis de hemo y de hierro, no se ha determinado exactamente la especificidad de sustrato de todos los sistemas ABC de mitocondrias de eucariotas.

El transportador mitocondrial más estudiado hasta la fecha es Atm1 de *S. cerevisiae*, cuya ausencia presenta el fenotipo más distintivo en comparación con la delección de *MDL1* y *MDL2* (si bien la severidad del fenotipo *atm1Δ* es cepa dependiente) (Zutz y col., 2009). La función de Atm1 es crucial para la maduración de centros Fe-S citosólicos y esta proteína presenta homólogos en casi todos los eucariotas. La capacidad de otros transportadores, como ABCB6 o ABCB10 de humanos o las proteínas Mdl1 y Mdl2 de la propia *S. cerevisiae*, de rescatar el fenotipo mutante de *atm1Δ*, implica que estas otras proteínas podrían actuar como respaldo. Posiblemente posean un rol en el metabolismo de hemo, en el de los centros Fe-S o simplemente sólo suplan la función de Atm1 ante la ausencia de ésta. Observaciones similares se han obtenido con proteínas ortólogas de *L. major* y *T. brucei*, propuestas como los transportadores mitocondriales de hemo en los respectivos organismos (Martínez-García y col., 2016; Horáková y col., 2015). En *T. cruzi*, denominamos mtTcAbcB al candidato propuesto para transportar hemo a través de las membranas mitocondriales, y es homólogo no sólo a ABCB6 y Atm1 sino también a LmAtm y TbAtm. Sin embargo, la expresión de formas recombinantes de mtTcAbcB en células de *S. cerevisiae knock out* para los distintos transportadores de mitocondria no permitió restaurar las funciones de la organela, en las condiciones experimentales ensayadas en nuestro laboratorio ni tampoco en las utilizadas por el grupo de Martínez-García y colaboradores. Es importante recordar que si bien todas estas proteínas presentan alta homología entre sí, no existe en *Saccharomyces* un transportador mitocondrial de hemo identificado, siendo ésta la función que postulamos para mtTcAbcB. Si además

consideramos la distancia evolutiva existente entre levaduras y tripanosomátidos, estos aspectos podrían contribuir a la ausencia de complementación de función al utilizar a *Saccharomyces* como sistema heterólogo.

Por otro lado, las formas recombinantes de las proteínas Cox10 y Cox15 de *T. cruzi* estudiadas en nuestro laboratorio han sido localizadas en mitocondria y poseen actividad HOS y HAS, respectivamente. La actividad de la proteína TcCox10.His-GFP resultó más eficiente para complementar la delección *cox10Δ* de *S. cerevisiae*, en comparación con TcCox10.His, y esto podría responder a diferencias en la orientación de dichas proteínas en la membrana, en la estabilidad, en el plegamiento, o una combinación de las anteriores. Asimismo, la menor actividad de las HOS de *T. cruzi* registrada en comparación a ScCox10 podría deberse a que al menos parte de las proteínas sobreexpresadas sufran una degradación parcial, posean una localización alternativa a la mitocondrial o simplemente porque las secuencias de TcCox10 sean lo suficientemente diferentes a ScCox10 como para ser activas pero menos eficientes en su actividad HOS en la levadura.

En cambio, los ensayos realizados con la proteína TcCox15 mostraron un comportamiento opuesto: la fusión a GFP en el extremo C-terminal de TcCox15.His afectó negativamente la actividad y/o interacción de la proteína con otras al ser expresada en levaduras *cox15Δ* (Merli y col., 2017). Y la expresión de TcCox15.His en células de *S. cerevisiae cox15Δ* restaura la deficiencia respiratoria en todas las condiciones ensayadas con igual eficiencia que ScCox15, hecho que podría atribuirse a que tanto en *S. cerevisiae* como en *T. cruzi* las HAS estarían interaccionando con los mismos tipos de proteína (Cox10 que le cede el hemo O y proteínas del ensamblado de la CcO).

Dicho esto, y en base a la ruta que proponemos para el hemo en levaduras y en parásito, ScCox10 accedería al hemo directamente en la matriz mitocondrial, en cambio TcCox10 podría estar adaptada a interaccionar con algún transportador mitocondrial en *T. cruzi*, que le transferiría el hemo transportado. Podría tratarse del mismo mtTcAbcB, que se encuentra ausente en la levadura, constituyendo otra posible razón para la complementación deficiente de TcCox10 observada en *S. cerevisiae*. Por último, cabe la posibilidad que el paso catalizado por Cox10 esté regulado de manera distinta en *S. cerevisiae* y en *T. cruzi* y contribuya a las diferencias observadas en los

ensayos de complementación. Mientras tanto, TcCox15 sería capaz de interactuar con las mismas proteínas que ScCox15 y realizar su función HAS en *S. cerevisiae*.

Ambos ensayos de complementación han sido posibles debido a que en la levadura están identificados los ortólogos a TcCox10 y TcCox15. Ahora bien, los genes *COX10* y *COX15* de *P. falciparum* y *L. mexicana*, con alta homología a los genes que codifican para las HOS y HAS de *S. cerevisiae*, han sido estudiados en nuestro laboratorio de manera similar a cómo se estudiaron los genes correspondientes de *T. cruzi* (trabajo de Tesina de grado del Lic. J. Borra Beltrán). Hemos observado que estos genes no complementan a las respectivas levaduras *cox10Δ* y *cox15Δ* en las condiciones ensayadas. Esta es una situación muy distinta a lo observado con los genes codificantes de transportadores ABC mitocondriales de estos organismos.

En conjunto, nuestros resultados no invalidan la utilización de *S. cerevisiae* como sistema en el cual estudiar el metabolismo de hemo en *T. cruzi*. Se han obtenido resultados positivos al expresar TcHTE, TcCox10 y TcCox15 por nuestro grupo de trabajo, y *TbMdl*, *TbAtm* y *LmABCB3* en otros grupos de investigación.

Por todo lo anterior, podemos concluir que *S. cerevisiae* constituye un excelente modelo cuando la función bajo estudio tiene su correlato natural en la levadura. En cambio, cuando no es este el caso, los resultados obtenidos probablemente no puedan responder todas las preguntas planteadas y se deberán tener en cuenta las limitaciones del modelo utilizado.

VII- Bibliografía

1. Affranchino J. L., Schwarcz de Tarlovsky M. N. y Stoppani A. O. (1986). Terminal oxidases in the trypanosomatid *Trypanosoma cruzi*. Comp Biochem Physiol B 85(2): 381-388.
2. Alarcon de Noya B., Diaz-Bello Z., Colmenares C., Ruiz-Guevara R., Mauriello L., Zavala-Jaspe R., Suarez J. A., Abate T., Naranjo L., Paiva M., Rivas L., Castro J., Marques J., Mendoza I., Acquatella H., Torres J. y Noya O. (2010). Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. J Infect Dis 201(9): 1308-1315.
3. Andrade L. O. y Andrews N. W. (2005). The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. Nat Rev Microbiol 3(10): 819-823.
4. Antonicka H., Leary S. C., Guercin G. H., Agar J. N., Horvath R., Kennaway N. G., Harding C. O., Jaksch M. y Shoubbridge E. A. (2003a). Mutations in COX10 result in a defect in mitochondrial heme A biosynthesis and account for multiple, early-onset clinical phenotypes associated with isolated COX deficiency. Hum Mol Genet 12(20): 2693-2702.
5. Antonicka H., Mattman A., Carlson C. G., Glerum D. M., Hoffbuhr K. C., Leary S. C., Kennaway N. G. y Shoubbridge E. A. (2003b). Mutations in COX15 produce a defect in the mitochondrial heme biosynthetic pathway, causing early-onset fatal hypertrophic cardiomyopathy. Am J Hum Genet 72(1): 101-114.
6. Anzaldi L. L. y Skaar E. P. (2010). Overcoming the heme paradox: heme toxicity and tolerance in bacterial pathogens. Infect Immun 78(12): 4977-4989.
7. Ardehali H., Chen Z., Ko Y., Mejia-Alvarez R. y Marban E. (2004). Multiprotein complex containing succinate dehydrogenase confers mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel activity. Proc Natl Acad Sci U S A 101(32): 11880-11885.
8. Ardehali H., O'Rourke B. y Marban E. (2005). Cardioprotective role of the mitochondrial ATP-binding cassette protein 1. Circ Res 97(8): 740-742.
9. Aslett M., Aurrecochea C., Berriman M., Brestelli J., Brunk B. P., Carrington M., Depledge D. P., Fischer S., Gajria B., Gao X., Gardner M. J., Gingle A., Grant G., Harb O. S., Heiges M., Hertz-Fowler C., Houston R., Innamorato F., Iodice J., Kissinger J. C., Kraemer E., Li W., Logan F. J., Miller J. A., Mitra S., Myler P. J., Nayak V., Pennington C., Phan I., Pinney D. F., Ramasamy G., Rogers M. B., Roos D. S., Ross C., Sivam D., Smith D. F., Srinivasamoorthy G., Stoeckert C. J. Jr., Subramanian S., Thibodeau R., Tivey A.,

- Treatman C., Velarde G. y Wang H. (2010). TriTrypDB: a functional genomic resource for the *Trypanosomatidae*. *Nucleic Acids Res* 38(Database issue): D457-462.
10. Atías A. *Parasitología Médica*. Editorial Mediterráneo, Santiago de Chile, Chile (2003).
 11. Atwood J. A., 3rd, Weatherly D. B., Minning T. A., Bundy B., Cavola C., Oppendoes F. R., Orlando R. y Tarleton R. L. (2005). The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science* 309(5733): 473-476.
 12. Bannai H., Tamada Y., Maruyama O., Nakai K. y Miyano S. (2002) Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics* 18 (2): 298-305.
 13. Bareth B., Dennerlein S., Mick D.U., Nikolov M., Urlaub H., y Rehling P. (2013). The heme a synthase Cox15 associates with cytochrome c oxidase assembly intermediates during Cox1 maturation. *Mol Cell Biol* 33, 4128-4137.
 14. Barros M. H., Carlson C. G., Glerum D. M. y Tzagoloff A. (2001). Involvement of mitochondrial ferredoxin and Cox15p in hydroxylation of heme O. *FEBS Lett* 492(1-2): 133-138.
 15. Barros M. H. y Tzagoloff A. (2002). Regulation of the heme A biosynthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 516(1-3): 119-123.
 16. Batista M., Marchini F. K., Celedon P. A., Fragoso S. P., Probst C. M., Preti H., Ozaki L. S., Buck G. A., Goldenberg S. y Krieger M. A. (2010). A high-throughput cloning system for reverse genetics in *Trypanosoma cruzi*. *BMC Microbiol* 10: 259.
 17. Bayeva, M., Khechaduri A., Wu R., Burke M. A., Wasserstrom J. A., Singh N., Liesa M., Shirihai O. S., Langer N. B., Paw B. H. y Ardehali H. (2013). ATP-binding cassette B10 regulates early steps of heme synthesis. *Circ Res* 113(3): 279-287.
 18. Bekri S., Kispal G., Lange H., Fitzsimons E., Tolmie J., Lill R. y Bishop D. F. (2000). Human ABC7 transporter: gene structure and mutation causing X-linked sideroblastic anemia with ataxia with disruption of cytosolic iron-sulfur protein maturation. *Blood* 96(9): 3256-3264.
 19. Bestwick M., Khalimonchuk O., Pierrel F. y Winge D. R. (2010). The role of Coa2 in hemylation of yeast Cox1 revealed by its genetic interaction with Cox10. *Mol Cell Biol* 30(1): 172-185.
 20. Boldogh I. R. y. Pon L. A (2007). Purification and subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Cell Biol* 80: 45-64.

21. Bollag D. M., Rozycki M. D. y Edelstein S. J. (1996) *Protein Methods*, 2da edn. Wiley- Liss, A John Wiley & Sons Inc Publication, Nueva York.
22. Botstein D., Chervitz S. A. y Cherry J. M. (1997) Yeast as a model organism. *Science* 277 (5330): 1259-60.
23. Bowman, I.B.R., Tobie, E.J., y Von Brand, T. (1963). CO₂ fixation studies with the culture form of *Trypanosoma cruzi*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 9, 105–114.
24. Brown B. M., Wang Z., Brown K. R., Cricco J. A. y Hegg E. L. (2004). Heme O synthase and heme A synthase from *Bacillus subtilis* and *Rhodobacter sphaeroides* interact in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 43(42): 13541-13548.
25. Brown K. R., Allan B. M., Do P. y Hegg E. L. (2002). Identification of novel hemes generated by heme A synthase: evidence for two successive monooxygenase reactions. *Biochemistry* 41(36): 10906-10913.
26. Buchensky C., Almiron P., Mantilla B. S., Silber A. M. y Cricco J. A. (2010). The *Trypanosoma cruzi* proteins TcCox10 and TcCox15 catalyze the formation of heme A in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 312(2): 133-141.
27. Bugiani M., Tiranti V., Farina L., Uziel G. y Zeviani M. (2005). Novel mutations in COX15 in a long surviving Leigh syndrome patient with cytochrome c oxidase deficiency. *J Med Genet* 42(5): e28.
28. Burke M. A. y Ardehali H. (2007). Mitochondrial ATP-binding cassette proteins. *Transl Res* 150(2): 73-80.
29. Cabello-Donayre M., Malagarie-Cazenave S., Campos-Salinas J., Galvez F. J., Rodriguez-Martinez A., Pineda-Molina E., Orrego L. M., Martinez-Garcia M., Sanchez-Canete M. P., Estevez A. M. y Perez-Victoria J. M. (2016). Trypanosomatid parasites rescue heme from endocytosed hemoglobin through lysosomal HRG transporters. *Mol Microbiol* 101(6): 895-908.
30. Camargo E. P. (1964). Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 6: 93-100.
31. Cavadini P., Biasiotto G., Poli M., Levi S., Verardi R., Zanella I., Derosas M., Ingrassia R., Corrado M. y Arosio P. (2007). RNA silencing of the mitochondrial ABCB7 transporter in HeLa cells causes an iron-deficient phenotype with mitochondrial iron overload. *Blood* 109(8): 3552-3559.

32. Cazzulo J. J. (1992). Energy metabolism in *Trypanosoma cruzi*. Subcell Biochem 18: 235-257.
33. Chagas C. (1909). Nova tripanozomiaze humana. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 1(2): 159-218.
34. Chang G. (2003). Multidrug resistance ABC transporters. FEBS Lett 555(1): 102-105.
35. Chen C., Samuel T. K., Krause M., Dailey H. A. y Hamza I. (2012). Heme utilization in the *Caenorhabditis elegans* hypodermal cells is facilitated by heme-responsive gene-2. J Biol Chem 287(12): 9601-9612.
36. Chen C., Samuel T. K., Sinclair J., Dailey H. A. y Hamza I. (2011). An intercellular heme-trafficking protein delivers maternal heme to the embryo during development in *C. elegans*. Cell 145(5): 720-731.
37. Chen W., Dailey H. A. y Paw B. H. (2010). Ferrochelatase forms an oligomeric complex with mitoferrin-1 and Abcb10 for erythroid heme biosynthesis. Blood 116(4): 628-630.
38. Chiabrando D., Marro S., Mercurio S., Giorgi C., Petrillo S., Vinchi F., Fiorito V., Fagoonee S., Camporeale A., Turco E., Merlo G. R., Silengo L., Altruda F., Pinton P. y E. Tolosano (2012). The mitochondrial heme exporter FLVCR1b mediates erythroid differentiation. J Clin Invest 122(12): 4569-4579.
39. Chiabrando D., Vinchi F., Fiorito V., Mercurio S. y Tolosano E. (2014). Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes. Front Pharmacol 5: 61.
40. Chloupková M., LeBard L. S. y Koeller D. M. (2003). MDL1 is a high copy suppressor of ATM1: evidence for a role in resistance to oxidative stress. J Mol Biol 331(1): 155-165.
41. Claros M. G. y Vincens P. (1996). Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. Eur J Biochem 241(3): 779-786.
42. Clayton C. y Shapira M. (2007). Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. Mol Biochem Parasitol 156(2): 93-101.
43. Clayton C. E. (1999). Genetic manipulation of kinetoplastida. Parasitol Today 15(9): 372-378.

44. Clayton, J. (2010). Chagas disease 101. *Nature* 465(7301): S4-5.
45. Coura J. R. (2006). Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 39 Suppl 3: 113-117.
46. Coura J. R., Junqueira A. C., Fernandes O., Valente S. A. y Miles M. A. (2002). Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol* 18(4): 171-176.
47. Coura J. R. y Vinas P. A. (2010). Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 465(7301): S6-7.
48. Crisp R. J., Pollington A., Galea C., Jaron S., Yamaguchi-Iwai Y. y Kaplan J. (2003) Inhibition of heme biosynthesis prevents transcription of iron uptake genes in yeast. *J Biol Chem* 278 (46): 45499-506.
49. Csere P., Lill R., y Kispal G. (1998). Identification of a human mitochondrial ABC transporter, the functional orthologue of yeast Atm1p. *FEBS Lett* 441(2): 266-270.
50. Cunha-e-Silva N., Sant'Anna C., Pereira M. G., Porto-Carreiro I., Jeovanio A. L. y de Souza W. (2006). Reserosomes: multipurpose organelles? *Parasitol Res* 99(4): 325-327.
51. Cupello M. P., Souza C. F., Buchensky C., Soares J. B., Laranja G. A., Coelho M. G., Cricco J. A. y Paes M. C. (2011). The heme uptake process in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is inhibited by heme analogues and by inhibitors of ABC transporters. *Acta Trop* 120(3): 211-218.
52. Dailey H. A. (1990) Conversion of coproporphyrinogen to protoheme in higher eukaryotes and bacteria: Terminal three enzymes. En *The biosynthesis of heme and chlorophylls*. Editorial McGraw-Hill. New York, NY, EE.UU.
53. DaRocha W. D., Otsu K., Teixeira S. M. y Donelson J. E. (2004). Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 133(2): 175-186.
54. Dassa E. (2003) Phylogenetic and functional classification of ABC (ATP-binding-cassette) system. En: Hollnad IB CS, Juchler K, Higgins CF, eds. *ABC proteins: from bacteria to man*. Londres, Inglaterra. Academic Press, 2003:3–35.
55. DeLano, W. L. (2002). Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsletter On Protein Crystallography*, 40: 82-92.

56. De Lima A. R., Navarro M. C., Arteaga R. Y. y Contreras V. T. (2008). Cultivation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes in low glucose axenic media shifts its competence to differentiate at metacyclic trypomastigotes. *Exp Parasitol* 119(3): 336-342.
57. de Souza W. (2002). Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des* 8(4): 269-285.
58. de Souza W. (2008). An introduction to the structural organization of parasitic protozoa. *Curr Pharm Des* 14(9): 822-838.
59. de Souza W. (2009). Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1: 89-100.
60. de Souza W., Attias M. y Rodrigues J. C. (2009). Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). *Int J Biochem Cell Biol* 41(10): 2069-2080.
61. de Souza W., de Carvalho T. M. y Barrias E. S. (2010). Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *Int J Cell Biol* 2010.
62. Dean M. (2005). The genetics of ATP-binding cassette transporters. *Methods Enzymol* 400: 409-429.
63. Dean M., Allikmets R., Gerrard B., Stewart C., Kistler A., Shafer B., Michaelis S. y Strathern J. (1994). Mapping and sequencing of two yeast genes belonging to the ATP-binding cassette superfamily. *Yeast* 10(3): 377-383.
64. Desuzinges-Mandon E., Arnaud O., Martinez L., Huche F., Di Pietro A. y Falson P. (2010). ABCG2 transports and transfers heme to albumin through its large extracellular loop. *J Biol Chem* 285(43): 33123-33133.
65. Diekert K., de Kroon A. I., Kispal G. y Lill R. (2001). Isolation and subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Cell Biol* 65: 37-51.
66. Dobson L., Remenyi I. y Tusnady G. E. (2015). CCTOP: a Consensus Constrained TOPology prediction web server. *Nucleic Acids Res* 43(W1): W408-412.
67. Duffy S. P., Shing J., Saraon P., Berger L. C., Eiden M. V., Wilde A. y Tailor C. S. (2010). The Fowler syndrome-associated protein FLVCR2 is an importer of heme. *Mol Cell Biol* 30(22): 5318-5324.
68. El-Sayed N. M., Myler P. J., Bartholomeu D. C., Nilsson D., Aggarwal G., Tran A. N., Ghedin E., Worthey E. A., Delcher A. L., Blandin G., Westenberger S. J., Caler E., Cerqueira G. C., Branche C., Haas B., Anupama A., Arner E., Aslund L., Attipoe P.,

Bontempi E., Bringaud F., Burton P., Cadag E., Campbell D. A., Carrington M., Crabtree J., Darban H., da Silveira J. F., de Jong P., Edwards K., Englund P. T., Fazelina G., Feldblyum T., Ferella M., Frasch A. C., Gull K., Horn D., Hou L., Huang Y., Kindlund E., Klingbeil M., Kluge S., Koo H., Lacerda D., Levin M. J., Lorenzi H., Louie T., Machado C. R., McCulloch R., McKenna A., Mizuno Y., Mottram J. C., Nelson S., Ochaya S., Osoegawa K., Pai G., Parsons M., Pentony M., Pettersson U., Pop M., Ramirez J. L., Rinta J., Robertson L., Salzberg S. L., Sanchez D. O., Seyler A., Sharma R., Shetty J., Simpson A. J., Sisk E., Tammi M. T., Tarleton R., Teixeira S., Van Aken S., Vogt C., Ward P. N., Wickstead B., Wortman J., White O., Fraser C. M., Stuart K. D. y Andersson B. (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309(5733): 409-415.

69. Emanuelsson O., Nielsen H., Brunak S. y von Heijne G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* 300(4): 1005-1016.

70. Fernandes M. C. y Andrews N. W. (2012). Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. *FEMS Microbiol Rev* 36(3): 734-747.

71. Ferrero L. V. (2014) Estudio estructural y funcional de la enzima hemo O sintasa de *Trypanosoma cruzi*. Tesina de grado. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

72. Fulop V., Sam K. A., Ferguson S. J., Ginger M. L. y Allen J. W. (2009). Structure of a trypanosomatid mitochondrial cytochrome c with heme attached via only one thioether bond and implications for the substrate recognition requirements of heme lyase. *FEBS J* 276(10): 2822-2832.

73. Furuyama K., Kaneko K. y Vargas P. D. (2007). Heme as a magnificent molecule with multiple missions: heme determines its own fate and governs cellular homeostasis. *Tohoku J Exp Med* 213(1): 1-16.

74. Gaisne M., Becam A. M., Verdiere J. y Herbert C. J. (1999) A 'natural' mutation in *Saccharomyces cerevisiae* strains derived from S288c affects the complex regulatory gene HAP1 (CYP1). *Curr Genet* 36 (4): 195-200.

75. Geer L. Y., Domrachev M., Lipman D. J. y Bryant S. H. (2002). CDART: protein homology by domain architecture. *Genome Res* 12(10): 1619-1623.

76. Gietz R. D. y Woods R. A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350: 87-96.
77. Glerum D. M., Muroff I., Jin C. y Tzagoloff A. (1997). COX15 codes for a mitochondrial protein essential for the assembly of yeast cytochrome oxidase. *J Biol Chem* 272(30): 19088-19094.
78. Hamza I. y Dailey H. A. (2012). One ring to rule them all: trafficking of heme and heme synthesis intermediates in the metazoans. *Biochim Biophys Acta* 1823(9): 1617-1632.
79. Hannibal L., Collins D., Brassard J., Chakravarti R., Vempati R., Dorlet P., Santolini J., Dawson J. H. y Stuehr D. J. (2012) Heme binding properties of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* 51(43): 8514-29.
80. Hausmann A., Samans B., Lill R. y Muhlenhoff U. (2008). Cellular and mitochondrial remodeling upon defects in iron-sulfur protein biogenesis. *J Biol Chem* 283(13): 8318-8330.
81. Hederstedt L. (2012). Heme A biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 1817(6): 920-927.
82. Higgins C.F. y Linton K.J. (2003) ABC transporters: an introduction and overview. En: Holland IB, Cole SP, Kuchler K, Higgins CF, eds. *ABC Proteins: from bacteria to man*. San Diego, California. Academic Press; xvii–xxii.
83. Hofmann K. y Stoffel W. (1993) TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem*, 374, 166-180.
84. Hogue D. L., Liu L., y Ling V. (1999). Identification and characterization of a mammalian mitochondrial ATP-binding cassette membrane protein. *J Mol Biol* 285(1): 379-389.
85. Horáková E., Changmai P., Paris Z., Salmon D. y Lukes J. (2015). Simultaneous depletion of Atm and Mdl rebalances cytosolic Fe-S cluster assembly but not heme import into the mitochondrion of *Trypanosoma brucei*. *FEBS J* 282(21): 4157-4175.
86. Huynh C., Yuan X., Miguel D. C., Renberg R. L., Protchenko O., Philpott C. C., Hamza I. y Andrews N. W. (2012). Heme uptake by *Leishmania amazonensis* is mediated by the transmembrane protein LHR1. *PLoS Pathog* 8(7): e1002795.

87. Hyde B. B., Liesa M., Elorza A. A., Qiu W., Haigh S. E., Richey L., Mikkola H. K., Schlaeger T. M. y Shiriha O. S. (2012). The mitochondrial transporter ABC-me (ABCB10), a downstream target of GATA-1, is essential for erythropoiesis in vivo. *Cell Death Differ* 19(7): 1117-1126.
88. Jungwirth H. y Kuchler K. (2006). Yeast ABC transporters-- a tale of sex, stress, drugs and aging. *FEBS Lett* 580(4): 1131-1138.
89. Karathia H., Vilaprinyo E., Sorribas A. y Alves R. (2011) *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. *PLoS One* 6 (2): e16015.
90. Kataoka T., Powers S., Cameron S., Fasano O., Goldfarb M., Broach J. y Wigler M. (1985). Functional homology of mammalian and yeast RAS genes. *Cell* 40(1): 19-26.
91. Keel S.B., Doty R.T., Yang Z., Quigley J.G., Chen J., Knoblauch S., Kingsley P.D., De Domenico I., Vaughn M.B., Kaplan J., Palis J. y Abkowitx J. L. (2008). A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis. *Science* 319, 825-828.
92. Khalimonchuk O., Bestwick M., Meunier B., Watts T. C. y Winge D. R. (2010). Formation of the redox cofactor centers during Cox1 maturation in yeast cytochrome oxidase. *Mol Cell Biol* 30(4): 1004-1017.
93. Khalimonchuk O., Kim H., Watts T., Perez-Martinez X. y Winge D. R. (2012). Oligomerization of heme o synthase in cytochrome oxidase biogenesis is mediated by cytochrome oxidase assembly factor Coa2. *J Biol Chem* 287(32): 26715-26726.
94. Khan A. A. y Quigley J. G. (2011). Control of intracellular heme levels: heme transporters and heme oxygenases. *Biochim Biophys Acta* 1813(5): 668-682.
95. Kispal G., Csere P., Prohl C. y Lill R. (1999). The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J* 18(14): 3981-3989.
96. Kispal G., Csere P., Guiard B. y Lill R. (1997) The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis. *FEBS Lett* 418 (3): 346-50.
97. Kiss K., Brozik A., Kucsma N., Toth A., Gera M., Berry L., Vallentin A., Vial H., Vidal M. y Szakacs G. (2012). Shifting the paradigm: the putative mitochondrial protein ABCB6 resides in the lysosomes of cells and in the plasma membrane of erythrocytes. *PLoS One* 7(5): e37378.

98. Korený L., Lukes J. y Obornik M. (2010). Evolution of the haem synthetic pathway in kinetoplastid flagellates: an essential pathway that is not essential after all? *Int J Parasitol* 40(2): 149-156.
99. Krishnamurthy P. y Schuetz J. D. (2005). The ABC transporter Abcg2/Bcrp: role in hypoxia mediated survival. *Biometals* 18(4): 349-358.
100. Krishnamurthy P., Xie T. y Schuetz J. D. (2007). The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. *Pharmacol Ther* 114(3): 345-358.
101. Krishnamurthy P. C., Du G., Fukuda Y., Sun D., Sampath J., Mercer K. E., Wang J., Sosa-Pineda B., Murti K. G. y Schuetz J. D. (2006). Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter. *Nature* 443(7111): 586-589.
102. Kumar S. y Bandyopadhyay U. (2005). Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett* 157(3): 175-188.
103. Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
104. Lara F. A., Sant'anna C., Lemos D., Laranja G. A., Coelho M. G., Reis Salles I., Michel A., Oliveira P. L., Cunha E. S. N., Salmon D. y Paes M. C. (2007). Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem Biophys Res Commun* 355(1): 16-22.
105. Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J. y Higgins D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948.
106. Lee B. Y., Bacon K. M., Bottazzi M. E. y Hotez P. J. (2013). Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect Dis* 13(4): 342-348.
107. Leighton J. y Schatz G. (1995). An ABC transporter in the mitochondrial inner membrane is required for normal growth of yeast. *EMBO J* 14(1): 188-195.
108. Leprohon P., Legare D., Girard I., Papadopoulou B. y Ouellette M. (2006) Modulation of *Leishmania* ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites. *Eukaryot Cell* 5 (10): 1713-25
109. Linton K. J. y Higgins C. F. (1998). The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol Microbiol* 28(1): 5-13.

110. Locher K. P. (2016). Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nat Struct Mol Biol* 23(6): 487-493.
111. Lockshon D., Surface L. E., Kerr E. O., Kaeberlein M. y Kennedy B. K. (2007). The sensitivity of yeast mutants to oleic acid implicates the peroxisome and other processes in membrane function. *Genetics* 175(1): 77-91.
112. Machado-de-Assis G. F., Diniz G. A., Montoya R. A., Dias J. C., Coura J. R., Machado-Coelho G. L., Albajar-Vinas P., Torres R. M. y Lana M. (2013). A serological, parasitological and clinical evaluation of untreated Chagas disease patients and those treated with benznidazole before and thirteen years after intervention. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108(7): 873-880.
113. Martinez-Garcia M., Campos-Salinas J., Cabello-Donayre M., Pineda-Molina E., Galvez F. J., Orrego L. M., Sanchez-Canete M. P., Malagarie-Cazenave S., Koeller D. M. y Perez-Victoria J. M. (2016). LmABCB3, an atypical mitochondrial ABC transporter essential for *Leishmania major* virulence, acts in heme and cytosolic iron/sulfur clusters biogenesis. *Parasit Vectors* 9: 7.
114. Mavridou D. A., Ferguson S. J. y Stevens J. M. (2013). Cytochrome c assembly. *IUBMB Life* 65(3): 209-216.
115. Medlock A. E., Shiferaw M. T., Marcero J. R., Vashisht A. A., Wohlschlegel J. A., Phillips J. D. y Dailey H. A. (2015). Identification of the Mitochondrial Heme Metabolism Complex. *PLoS One* 10(8): e0135896.
116. Menéndez Bravo S. M. (2011) Estudio de proteínas mitocondriales de *Trypanosoma cruzi* involucradas en el metabolismo de hemo. Tesina de grado. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario, Argentina.
117. Mense S. M. y Zhang L. (2006). Heme: a versatile signaling molecule controlling the activities of diverse regulators ranging from transcription factors to MAP kinases. *Cell Res* 16(8): 681-692.
118. Merli M. L., Cirulli B. A., Menéndez-Bravo S. M. y Cricco J. A. (2017). Heme A synthesis and CcO activity are essential for *Trypanosoma cruzi* infectivity and replication. *Biochem J* 474(14): 2315-2332.

119. Merli M. L., Pagura L., Hernández J., Barison M. J., Pral E. M., Silber A. M. y Cricco J. A. (2016). The *Trypanosoma cruzi* protein TcHTE is critical for heme uptake. *PLoS Negl Trop Dis* 10(1): e0004359.
120. Mewes H. W., Albermann K., Heumann K., Liebl S. y Pfeiffer F. (1997). MIPS: a database for protein sequences, homology data and yeast genome information. *Nucleic Acids Res* 25(1): 28-30.
121. Mitsuhashi N., Miki T., Senbongi H., Yokoi N., Yano H., Miyazaki M., Nakajima N., Iwanaga T., Yokoyama Y., Shibata T. y Seino S. (2000) MTABC3, a novel mitochondrial ATP-binding cassette protein involved in iron homeostasis. *J Biol Chem* 275 (23): 17536-40.
122. Minning T. A., Weatherly D. B., Atwood J., 3rd, Orlando R. y Tarleton R. L. (2009) The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* 10: 370
123. Mogi T. (2009). Over-expression and characterization of *Bacillus subtilis* heme O synthase. *J Biochem* 145(5): 669-675.
124. Moraes C. T., Diaz F. y Barrientos A. (2004). Defects in the biosynthesis of mitochondrial heme c and heme a in yeast and mammals. *Biochim Biophys Acta* 1659(2-3): 153-159.
125. Morales J., Mogi T., Mineki S., Takashima E., Mineki R., Hirawake H., Sakamoto K., Omura S y Kita K. (2009) Novel mitochondrial complex II isolated from *Trypanosoma cruzi* is composed of 12 peptides including a heterodimeric lp subunit. *JBC* 284(11): 7255-7263.
126. Morillo C. A., Marin-Neto J. A., Avezum A., Sosa-Estani S., Rassi A., Jr., Rosas F., Villena E., Quiroz R., Bonilla R., Britto C., Guhl F., Velazquez E., Bonilla L., Meeks B., Rao-Melacini P., Pogue J., Mattos A., Lazdins J., Rassi A., Connolly S. J. y Yusuf S. (2015). Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med* 373(14): 1295-1306.
127. Mumberg D., Muller R. y Funk M. (1994). Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Res* 22(25): 5767-5768.
128. Nogueira F. B., Ruiz J. C., Robello C., Romanha A. J. y Murta S. M. (2009). Molecular characterization of cytosolic and mitochondrial trypanothione peroxidase in

Trypanosoma cruzi populations susceptible and resistant to benznidazole. *Parasitol Res* 104(4): 835-844.

129. Nunes M. P., Coutinho S. G., Louis J. A. y Souza W. J. (1990) *Trypanosoma cruzi*: quantification in tissues of experimentally infected mice by limiting dilution analysis. *Exp Parasitol* 70 (2): 186-92.

130. Opperdoes F. R., Borst P., y Spits H. (1977). Particle-bound enzymes in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *Eur J Biochem* 76(1): 21-28.

131. Oquendo C. E., Antonicka H., Shoubbridge E. A., Reardon W. y Brown G. K. (2004). Functional and genetic studies demonstrate that mutation in the COX15 gene can cause Leigh syndrome. *J Med Genet* 41(7): 540-544.

132. Paterson J. K., Shukla S., Black C. M., Tachiwada T., Garfield S., Wincovitch S., Ernst D. N., Agadir A., Li X., Ambudkar S. V., Szakacs G., Akiyama S. y Gottesman M. M. (2007). Human ABCB6 localizes to both the outer mitochondrial membrane and the plasma membrane. *Biochemistry* 46(33): 9443-9452.

133. Pecoul B., Batista C., Stobbaerts E., Ribeiro I., Vilasanjuan R., Gascon J., Pinazo M. J., Moriana S., Gold S., Pereiro A., Navarro M., Torrico F., Bottazzi M. E. y Hotez P. J. (2016). The BENEFIT Trial: Where Do We Go from Here? *PLoS Negl Trop Dis* 10(2): e0004343.

134. Petherick A. (2010). Chagas disease in the Chaco. *Nature* 465(7301): S18-20.

135. Pondarre C., Antiochos B. B., Campagna D. R., Clarke S. L., Greer E. L., Deck K. M., McDonald A., Han A. P., Medlock A., Kutok J. L., Anderson S. A., Eisenstein R. S. y Fleming M. D. (2006). The mitochondrial ATP-binding cassette transporter Abcb7 is essential in mice and participates in cytosolic iron-sulfur cluster biogenesis. *Hum Mol Genet* 15(6): 953-964.

136. Pondarre C., Campagna D. R., Antiochos B., Sikorski L., Mulhern H. y Fleming M. D. (2007). Abcb7, the gene responsible for X-linked sideroblastic anemia with ataxia, is essential for hematopoiesis. *Blood* 109(8): 3567-3569.

137. Puustinen A. y Wikstrom M. (1991). The heme groups of cytochrome o from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(14): 6122-6126.

138. Qiu A., Jansen M., Sakaris A., Min S. H., Chattopadhyay S., Tsai E., Sandoval C., Zhao R., Akabas M. H. y Goldman I. D. (2006). Identification of an intestinal folate

transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell* 127(5): 917-928.

139. Quigley J. G., Yang Z., Worthington M. T., Phillips J. D., Sabo K. M., Sabath D. E., Berg C. L., Sassa S., Wood B. L. y Abkowitz J. L. (2004). Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis. *Cell* 118(6): 757-766.

140. Rajagopal A., Rao A. U., Amigo J., Tian M., Upadhyay S. K., Hall C., Uhm S., Mathew M. K., Fleming M. D., Paw B. H., Krause M. y Hamza I. (2008). Haem homeostasis is regulated by the conserved and concerted functions of HRG-1 proteins. *Nature* 453(7198): 1127-1131.

141. Rao A. U., Carta L. K., Lesuisse E. y Hamza I. (2005). Lack of heme synthesis in a free-living eukaryote. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(12): 4270-4275.

142. Rassi A., Jr., Rassi A., y Marin-Neto J. A. (2010). Chagas disease. *Lancet* 375(9723): 1388-1402.

143. Rebeiz N., Arkins S., Kelley K. W. y Rebeiz C. A. (1996). Enhancement of coproporphyrinogen III transport into isolated transformed leukocyte mitochondria by ATP. *Arch Biochem Biophys* 333(2): 475-481.

144. Ribeiro M., Nitz N., Santana C., Moraes A., Hagstrom L., Andrade R., Rios A., Sousa A., Dallago B., Gurgel-Goncalves R. y Hecht M. (2016). Sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in murine model. *Exp Parasitol* 162: 1-6.

145. Ryter S. W. y Tyrrell R. M. (2000). The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med* 28(2): 289-309.

146. Saiki K., Mogi T., Ogura K. y Anraku Y. (1993). In vitro heme O synthesis by the cyoE gene product from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 268(35): 26041-26044.

147. Sambrook J., Fritsch E. F. y Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2nd. Edition. edn (New York, Cold Spring Harbor).

148. Sant'Anna C., de Souza W. y Cunha-e-Silva N. (2004). Biogenesis of the reservosomes of *Trypanosoma cruzi*. *Microsc Microanal* 10(5): 637-646.

149. Savary S., Allikmets R., Denizot F., Luciani M. F., Mattei M. G., Dean M. y Chimini G. (1997). Isolation and chromosomal mapping of a novel ATP-binding cassette transporter conserved in mouse and human. *Genomics* 41(2): 275-278.

150. Schneider C. A., Rasband W. S. y Eliceiri K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9(7): 671-675.
151. Schofield C. J. y Gorla D. E (2010) Who, how, what and where?. *Outlook: Chagas Disease. Nature* 465, S8—S9 .
152. Schofield C. J., Jannin J. y Salvatella R. (2006). The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol* 22(12): 583-588.
153. Schuster F. L. y Sullivan J. J. (2002). Cultivation of clinically significant hemoflagellates. *Clin Microbiol Rev* 15(3): 374-389.
154. Severance S., Rajagopal A., Rao A. U., Cerqueira G. C., Mitreva M., El-Sayed N. M., Krause M. y Hamza I. (2010). Genome-wide analysis reveals novel genes essential for heme homeostasis in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 6(7): e1001044.
155. Shayeghi M., Latunde-Dada G. O., Oakhill J. S., Laftah A. H., Takeuchi K., Halliday N., Khan Y., Warley A., McCann F. E., Hider R. C., Frazer D. M., Anderson G. J., Vulpe C. D.,
156. Shirihai O. S., Gregory T., Yu C., Orkin S. H. y Weiss M. J. (2000). ABC-me: a novel mitochondrial transporter induced by GATA-1 during erythroid differentiation. *EMBO J* 19(11): 2492-2502.
157. Silva T. M., Peloso E. F., Vitor S. C., Ribeiro L. H. y Gadelha F. R. (2011). O₂ consumption rates along the growth curve: new insights into *Trypanosoma cruzi* mitochondrial respiratory chain. *J Bioenerg Biomembr* 43(4): 409-417.
158. Small I., Peeters N., Legeai F. y Lurin C. (2004) Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics* 4 (6): 1581-90
159. Schneider C.A., Rasband W.S., y Eliceiri K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9, 671-675.
160. Stoppani A. O., Docampo R., de Boiso J. F. y Frasch A. C. (1980). Effect of inhibitors of electron transport and oxidative phosphorylation on *Trypanosoma cruzi* respiration and growth. *Mol Biochem Parasitol* 2(1): 3-21.
161. Szakacs G., Annereau J. P., Lababidi S., Shankavaram U., Arciello A., Bussey K. J., Reinhold W., Guo Y., Kruh G. D., Reimers M., Weinstein J. N. y Gottesman M. M. (2004). Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells. *Cancer Cell* 6(2): 129-137.

162. Taketani S., Kakimoto K., Ueta H., Masaki R. y Furukawa T. (2003). Involvement of ABC7 in the biosynthesis of heme in erythroid cells: interaction of ABC7 with ferrochelatase. *Blood* 101(8): 3274-3280.
163. Taylor M. C., Huang H. y Kelly J. M. (2011). Genetic techniques in *Trypanosoma cruzi*. *Adv Parasitol* 75: 231-250.
164. Taylor M. C. y Kelly J. M. (2006). pTcINDEX: a stable tetracycline-regulated expression vector for *Trypanosoma cruzi*. *BMC Biotechnol* 6: 32.
165. Thorsness M., Schafer W., D'Ari L. y Rine J. (1989) Positive and negative transcriptional control by heme of genes encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 9 (12): 5702-12.
166. Tielens A. G. y van Hellemond J. J. (2009). Surprising variety in energy metabolism within *Trypanosomatidae*. *Trends Parasitol* 25(10): 482-490.
167. Tripodi K. E., Menendez Bravo S. M. y Cricco J. A. (2011). Role of heme and heme-proteins in trypanosomatid essential metabolic pathways. *Enzyme Res* 2011: 873230.
168. Tsuchida M., Emi Y., Kida Y. y Sakaguchi M. (2008). Human ABC transporter isoform B6 (ABCB6) localizes primarily in the Golgi apparatus. *Biochem Biophys Res Commun* 369(2): 369-375.
169. Tyler K. M. y Engman D. M. (2000). Flagellar elongation induced by glucose limitation is preadaptive for *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Cell Motil Cytoskeleton* 46(4): 269-278.
170. Tyler K. M. y Engman D. M. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol* 31(5-6): 472-481.
171. Tzagoloff A, Akai A y Needleman RB (1975) Assembly of the mitochondrial membrane system. Characterization of nuclear mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with defects in mitochondrial ATPase and respiratory enzymes. *J Biol Chem* 250: 8228–8235.
172. Ullu E., Tschudi C. y Chakraborty T. (2004). RNA interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol* 6(6): 509-519.
173. Valnot I., von Kleist-Retzow J. C., Barrientos A., Gorbatyuk M., Taanman J. W., Mehaye B., Rustin P., Tzagoloff A., Munnich A. y Rotig A. (2000). A mutation in the

human heme A:farnesyltransferase gene (COX10) causes cytochrome c oxidase deficiency. Hum Mol Genet 9(8): 1245-1249.

174. Vazquez M. P. y Levin M. J. (1999). Functional analysis of the intergenic regions of TcP2beta gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. Gene 239(2): 217-225.

175. Visser W., van Spronsen E. A., Nanninga N., Pronk J. T., Gijs Kuenen J. y van Dijken J. P. (1995). Effects of growth conditions on mitochondrial morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. Antonie Van Leeuwenhoek 67(3): 243-253.

176. Walker D. (1987). The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis (Sheffield, U.K., Robert Hill Institute, University of Sheffield).

177. Wandersman C. y Delepelaire P. (2004). Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. Annu Rev Microbiol 58: 611-647.

178. Wang Z., Wang Y., y Hegg E. L. (2009). Regulation of the heme A biosynthetic pathway: differential regulation of heme A synthase and heme O synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 284(2): 839-847.

179. Warren L. G. (1960). Metabolism of *Schizotrypanum cruzi* Chagas. I. Effect of culture age and substrate concentration on respiratory rate. J Parasitol 46: 529-539.

180. Warren M.J. y Smith A.G. (2009). Tetrapyrroles: Birth, Life, and Death. Landes Bioscience (Austin, Texas, EEUU), pp. 160-183.

181. Weissman Z., Shemer R., Conibear E. y Kornitzer D. (2008). An endocytic mechanism for haemoglobin-iron acquisition in *Candida albicans*. Mol Microbiol 69(1): 201-217.

182. Westermann B., y Neupert W. (2000). Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 16, 1421-1427.

183. Wilkens S. (2015). Structure and mechanism of ABC transporters. F1000Prime Rep 7: 14.

184. Wilkinson S. R., Obado S. O., Mauricio I. L. y Kelly J. M. (2002). *Trypanosoma cruzi* expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum. Proc Natl Acad Sci U S A 99(21): 13453-13458.

185. Yang Z., Philips J. D., Doty R. T., Giraudi P., Ostrow J. D., Tiribelli C., Smith A. y Abkowitz J. L. (2010). Kinetics and specificity of feline leukemia virus subgroup C receptor (FLVCR) export function and its dependence on hemopexin. *J Biol Chem* 285(37): 28874-28882.
186. Young L., Leonhard K., Tatsuta T., Trowsdale J. y Langer T. (2001). Role of the ABC transporter Mdl1 in peptide export from mitochondria. *Science* 291(5511): 2135-2138.
187. Yuan X., Fleming M. D. y Hamza I. (2013). Heme transport and erythropoiesis. *Curr Opin Chem Biol* 17(2): 204-211.
188. Yuan X., Protchenko O., Philpott C. C. y Hamza I. (2012). Topologically conserved residues direct heme transport in HRG-1-related proteins. *J Biol Chem* 287(7): 4914-4924.
189. Zee J. M. y Glerum D. M. (2006). Defects in cytochrome oxidase assembly in humans: lessons from yeast. *Biochem Cell Biol* 84(6): 859-869.
190. Zhang F., Hogue D. L., Liu L., Fisher C. L., Hui D., Childs S. y Ling V. (2000). M-ABC2, a new human mitochondrial ATP-binding cassette membrane protein. *FEBS Lett* 478(1-2): 89-94.
191. Zutz A., Gompf S., Schagger H. y Tampe R. (2009). Mitochondrial ABC proteins in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1787(6): 681-690.